



TESIS DOCTORAL

Represión catabólica de la ruta de degradación de tetralina en *Sphingopyxis macrogolitabida* TFA



Helena Gómez Álvarez

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica

TESIS DOCTORAL

**Represión catabólica de la ruta de degradación de tetralina en *Sphingopyxis
macrogolita* TFA**

Memoria presentada por **Helena Gómez Álvarez** para optar al grado de Doctora

Sevilla, 18 de septiembre de 2014

Vº Bº. La Directora

Vº Bº. El Director

Belén Floriano Pardal

Profesora Titular

Dpto. Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica
Universidad Pablo de Olavide

Eduardo Santero Santurino

Catedrático

Dpto. Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica
Universidad Pablo de Olavide

AGRADECIMIENTOS

Me hace muy feliz estar al final del proceso de mi Tesis doctoral pero, tanto igual, volver la vista atrás y darme cuenta de cuánta gente maravillosa me ha apoyado, confiado en mí, ayudado y dado ánimos. Mi gratitud es inmensa.

A Belén y Eduardo quiero agradecerles que me permitieran trabajar junto a ellos en este grupo, que me hayan enseñado el camino tantas veces y que hayan sacado siempre tiempo de donde no lo tenían. A ellos los primeros, muchas gracias.

A Eva, Carlos, Amando e Inés, por todos los consejos cotidianos y los ánimos. A Fernan, por contagiar tanta pasión científica. A Paqui, por estar siempre dispuesta a ayudar y a escuchar.

A las niñas: grandes, medianas y pequeñas, porque el grupo no sería nada sin los ratos de amistad, generosidad y alegría que se comparten a diario. A Laura T., a Aroa, a Ana H. y a Cris, por el ejemplo de trabajo bien hecho y por todo lo que nos han ayudado siempre a las que llegamos después. A Laura T., por hacer de *postdoc* en mis inicios y compartir codo a codo las alegrías con TFB y el naftaleno, por enseñarme a hacer proteómica y por estar disponible inmediatamente cada vez que me surgió una duda. A Bea, Guada y Laura Te., por compartir tan de cerca el día a día, por todos los ratos que me han escuchado e intentado ayudarme. A Guada, por ser la mejor técnico que pueda tener un laboratorio. A Nuria, por hacer de los laboratorios de prácticas un lugar donde da gusto trabajar. A Ali, Isa y Ana P., por el optimismo y las sonrisas. A Laura L., por ser un alma tan jolgoriosa y divertida y contagiar tanto ánimo. A Inmita, por la inestimable ayuda que ha supuesto con la construcción del mutante HPrK cuando ya estábamos fuera de todos los tiempos, por devolverme la ilusión de la ciencia cuando se comparte, por los brotes de risa incontenible. A Elenita y Sofi, por haberse convertido en mis dos pilares de sustento en el laboratorio, por ser ambas un ejemplo de superación, de esfuerzo, de cercanía... por tantísimo apoyo y generosidad. A Sofi, por querer ayudarme tanto en los inicios, por ser una compañera de piso y una amiga inigualable las 24 horas, por tanta confidencia y alegría compartidas.

A Michael Hecker, por darme la oportunidad de hacer una estancia de investigación en Greifswald. A Birgit Voigt y Susanne, por una ayuda tan cercana y generosa. A Maria y Nathan, por tantos buenos ratos dentro y fuera del laboratorio.

A los amigos del máster y del *coffee-time*: Elena, Máriam, Sofi, Mario, Mer, Ana, David, Calero, Miriam, Marta, Pako y Jose, por recorrer este camino juntos y por transformar ese intervalo del día en una burbuja llena de buenos momentos y risas inagotables. Por toda la diversión y amistad compartida también fuera del CABD.

A todos los miembros del CABD que de alguna u otra manera han participado en mi trabajo o lo han hecho posible.

A mis amigos de toda la vida, y en especial a Julia, Yago, Tania, Rafa y Carlos, por el cariño con el que siempre se preocupan de mí y de mis “bichitos”.

A mi familia, en especial a mis padres, por la motivación y el amor infinitos que recibo siempre, siempre de ellos. A mi abuela, por haberme contagiado el optimismo y la alegría para el resto de mi vida. A mis hermanos, Ernesto y Manolo, por ser unos “cavernícolas” tan divertidos; a Ernesto, por compartir la ilusión por la biología. A mi otra familia: a Amalia, Alfonso, Amalilla, Justin y Antonio: por el aporte extra de ánimos y abrazos. A Alfonso, por tantas veces que me ha empujado y acompañado hacia el reencuentro de la confianza, el entusiasmo y la ilusión.

INTRODUCCIÓN

1. Degradación de compuestos aromáticos y represión catabólica	19
2. Base molecular de la represión catabólica en las bacterias modelo	22
2.1. Represión catabólica en <i>Escherichia coli</i>	22
2.2. Represión catabólica en <i>Bacillus subtilis</i>	25
2.3. Represión catabólica en el género <i>Pseudomonas</i>	27
2.4. Represión catabólica en <i>Shinorhizobium meliloti</i>	31
3. Reguladores transcripcionales implicados en represión catabólica de rutas de degradación de compuestos aromáticos	35
3.1. El regulador BphQ en <i>Acidovorax sp</i>	35
3.2. El regulador AccR en <i>Azoarcus sp.</i> CIB	36
3.3. El regulador tipo CRP en <i>Rhodococcus sp.</i> TFB	36
4. Degradación de tetralina en <i>Sphingopyxis macrogolitabida</i> estirpe TFA	38
4.1. La ruta de degradación de tetralina	39
4.2. Regulación específica de los genes <i>thn</i> de TFA	42
4.3. Regulación global de la ruta de degradación de tetralina	46

OBJETIVOS	53
------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estirpes, plásmidos y condiciones de cultivo	59
1.1. Estirpes y plásmidos	59
1.2. Medios y condiciones de cultivo	64
1.3. Conservación de estirpes bacterianas	66
2. Transferencia de ADN a estirpes bacterianas	66
2.1. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> mediante choque térmico.	66
2.1.1. Preparación de células competentes	66
2.1.2. Transformación	67
2.2. Electrotransformación de <i>Sphingopyxis macrogolitabida</i>	67
2.2.1. Preparación de células electrocompetentes	67
2.2.2. Electroporación	68
2.3. Conjugación triparental	68
3. Manipulación de ácidos nucleicos	68
3.1. Manipulación de ADN	68
3.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> a pequeña escala	69
3.1.2. Aislamiento de ADN total de <i>S. macrogolitabida</i>	69
3.1.3. Purificación de fragmentos de ADN	70

3.1.4. Clonación de fragmentos de ADN	70
3.1.5. Detección de secuencias de ADN por hibridación en membrana (Southern blot)	70
3.1.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	72
3.1.7. Secuenciación	74
3.1.8. Construcción de mutantes de inserción, delección o sustitución	75
3.1.9. Construcción de mutantes condicionales.	78
3.2. Manipulación de ARN	81
3.2.1. Aislamiento de ARN de <i>Sphingopyxis macrogolitabida</i>	81
3.2.2. Obtención de cDNA	82
3.3. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	82
3.4. Cuantificación de ácidos nucleicos	83
4. Manipulación de proteínas	83
4.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS monodimensionales	83
4.2. Electroforesis de proteínas marcadas con fluoróforos en geles de poliacrilamida- SDS bidimensionales (2D-DIGE)	84
4.2.1. Obtención y limpieza del extracto total de proteína	84
4.2.2. Cuantificación de la concentración de proteínas en los extractos	85
4.2.3. Marcaje de los extractos con fluoróforos	85
4.2.4. Resolución en geles de poliacrilamida desnaturalizantes	85
4.2.5. Análisis de los geles 2D-DIGE mediante el programa DeCyder	87
4.2.6. Tinción de los geles con plata	87
4.2.7. Identificación de las proteínas de interés	88
4.3. Electroforesis de proteínas marcadas con ³⁵ S-Metionina en geles de poliacrilamida- SDS bidimensionales	88
4.3.1. Obtención del extracto total de proteína marcado con ³⁵ S-Metionina	88
4.3.2. Cuantificación de la concentración de proteínas en los extractos	89
4.3.3. Cuantificación del marcaje radiactivo de los extractos de proteínas	89
4.3.4. Resolución en geles de poliacrilamida desnaturalizantes	90
4.3.5. Secado y exposición de los geles de acrilamida	91
4.3.6. Análisis de los geles radiactivos mediante el programa Delta2D	91
4.3.7. Tinción de los geles con Coomassie	91
4.3.8. Identificación de las proteínas de interés	92
4.4. Ensayo de actividad extradiol dioxigenasa	92
5. Análisis de la expresión génica	93
5.1. Ensayos de actividad β-galactosidasa	93
5.1.1. Obtención de cultivos para medida de expresión <i>lacZ</i> regulada por salicilato.	93
5.1.2. Obtención de cultivos para medida de inducción <i>thn</i>	94
5.1.3. Desarrollo del ensayo β-galactosidasa	95
5.2. PCR cuantitativa a tiempo real	96
6. Cuantificación de gránulos de PHB en las células	98

RESULTADOS

1. Fisiología del fenómeno de represión catabólica en <i>Sphingopyxis macrogolitabida</i> TFA	103
1.1. Crecimiento de TFA en diferentes fuentes de carbono e inducción de los genes <i>thn</i>	103
1.2. Crecimiento de MPO209 en diferentes fuentes de carbono e inducción de los genes <i>thn</i>	107
1.3. Análisis de la represión catabólica a nivel transcripcional	109
2. Caracterización a nivel proteómico del fenómeno de represión catabólica en <i>Sphingopyxis macrogolitabida</i> TFA	111
2.1. Comparación de dos proteomas estáticos: condición de inducción de los genes <i>thn</i> vs. condición de represión catabólica	111
2.2. Estudio de la dinámica del proteoma tras el estímulo de represión catabólica	120
3. Construcción de mutantes de <i>Sphingopyxis macrogolitabida</i> TFA en posibles genes reguladores	135
3.1. Construcción de un mutante carente del regulador transcripcional CdnL	135
3.2. Construcción de un mutante carente de la proteína transductora de señales con dominios CBS	145
3.2.1. Caracterización del fenotipo de crecimiento en la estirpe MPO816	147
3.2.2. Caracterización de la inducción de los genes <i>thn</i> en la estirpe MPO816	148
3.2.3. Caracterización de la represión catabólica sobre los genes <i>thn</i> en la estirpe MPO816	150
4. Construcción de mutantes de <i>S. macrogolitabida</i> TFA en elementos implicados en represión catabólica previamente descritos en otras bacterias.	152
4.1. Construcción de mutantes carentes del sistema de dos componentes FixLJ	153
4.1.1. Caracterización del fenotipo de crecimiento en los mutantes <i>fixLJ</i> .	157
4.1.2. Caracterización de la actividad ThnC (extradiol dioxigenasa) en los mutantes <i>fixLJ</i>	158
4.2. Construcción de mutantes carentes de componentes del sistema fosfotransferasa (PTS)	159
4.2.1. Construcción y caracterización de un mutante carente de HprK _{relA} en TFA	163
4.2.2. Construcción y caracterización de un mutante carente de HprK en TFA	169
4.2.3. Construcción y caracterización de un mutante carente de Hpr en TFA	172

DISCUSIÓN

1. Fisiología del fenómeno de represión catabólica en <i>Sphingopyxis macrogolitabida</i> TFA	188
1.1. Análisis del crecimiento y la inducción de los genes <i>thn</i> en condiciones de represión catabólica	188
1.2. Análisis del proteoma de TFA en condiciones de represión catabólica	189

2. Elementos específicos potencialmente implicados en represión catabólica	200
2.1. El regulador transcripcional CdnL	200
2.2. La proteína transductora de señales con dominios CBS	205
2.3. La quinasa sensora FixL y el regulador transcripcional FixJ	206
3. El sistema PTS y el fenómeno de represión catabólica en TFA	209
 CONCLUSIONES	 215
 ANEXO	 219
 BIBLIOGRAFÍA	 223

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Estirpes bacterianas utilizadas durante la realización de esta Tesis	59
Tabla 2	Plásmidos utilizados durante la realización de esta Tesis	61
Tabla 3	Concentraciones de antibióticos y otros agentes químicos añadidos a los medios de cultivo	66
Tabla 4	Oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR para clonaciones	72
Tabla 5	Oligonucleótidos utilizados en RT-qPCR	98
Tabla 6	Proteínas detectadas en los experimentos 2D-DIGE	112
Tabla 7	Identificación, mediante espectrometría de masas (MALDI-MS), de las proteínas inducidas por tetralina en TFA	114
Tabla 8	Identificación, mediante espectrometría de masas (MALDI-MS), de proteínas inducidas en tetralina+ β -HB 40 mM en TFA	117
Tabla 9	Proteínas, inducidas o reprimidas, detectadas a lo largo del tiempo tras el estímulo de represión catabólica en los experimentos de proteómica radiactiva	122
Tabla 10	Identificación, mediante espectrometría de masas, de proteínas que “apagan” su expresión tras la adición de β -HB a cultivos de TFA creciendo en tetralina	128
Tabla 11	Identificación, mediante espectrometría de masas, de proteínas sintetizadas de novo tras la adición de β -HB a un cultivo de TFA creciendo en tetralina	132
Tabla 12	Parecido de la proteína CdnL de <i>S. macrogolitabida</i> TFA a las correspondientes de <i>M. xanthus</i> , <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. smegmatis</i>	137
Tabla 13	Actividad ThnC en TFA silvestre y en los mutantes <i>fixL</i> , <i>fixJ</i>	159
Tabla 14	Nivel de parecido de las proteínas PTS de <i>S. macrogolitabida</i> TFA con respecto a las homólogas de <i>S. melilloti</i>	161
Tabla 15	Tiempos de generación de TFA silvestre y de MPO815 en los distintos medios analizados	176

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema del sistema PEP-PTS de <i>E.coli</i>	23
Figura 2	Esquema del sistema PEP-PTS de <i>B. subtilis</i>	26
Figura 3	Represión catabólica mediada por el regulador Crc en <i>P. putida</i>	29

Figura 4 Organización de los genes <i>hprK</i> , <i>EIIA</i> y <i>hpr</i> en el cromosoma de <i>S. meliloti</i>	31
Figura 5 Modelo del sistema PTS ^{Ntr} de <i>S. meliloti</i>	32
Figura 6 Molécula de tetralina	38
Figura 7 Organización génica de los operones implicados en la degradación de tetralina en TFA	40
Figura 8 Ruta de degradación de tetralina en TFA	41
Figura 9 Secuencias reconocidas por ThnR en los promotores M, H, B y C	43
Figura 10 Modelo propuesto de regulación de la ruta de degradación de tetralina en TFA	45
Figura 11 Expresión de la fusión <i>thnC::lacZ</i> en TFA en distintas condiciones de represión catabólica	47
Figura 12 Expresión de la fusión <i>thnC::lacZ</i> en TFA (o) y en los mutantes afectados en <i>phaC</i> en condiciones de represión catabólica	49
Figura 13 Acumulación de PHB en TFA, en el mutante MPO209 afectado en <i>phaC</i> y en el mismo mutante complementado	50
Figura 14 Sistemas de cultivo de <i>S. macroglotabida</i> TFA en presencia de tetralina	65
Figura 15 Construcción del mutante condicional en <i>cdnL</i>	80
Figura 16 Obtención de cultivos para ensayos β -galactosidasa	95
Figura 17 Curvas de crecimiento de TFA-1002 e inducción de la fusión <i>thnC::lacZ</i> en MM + tetralina + β -HB 20 mM, MM + tetralina + β -HB 40 mM o en las fuentes de carbono por separado	104
Figura 18 Curvas de crecimiento de TFA-1002 e inducción de la fusión <i>thnC::lacZ</i> en MM + tetralina, tetralina + HB 40mM o tetralina + ácido sebácico 15,9mM	107
Figura 19 Curvas de crecimiento de MPO209-1002 e inducción de la fusión <i>thnC::lacZ</i> en MM + tetralina (rojo), tetralina + HB 40mM (negro) o tetralina + ácido sebácico 15,9mM	108
Figura 20 Cuantificación de la expresión de los genes <i>thnB</i> y <i>thnR</i> mediante RT-qPCR en TFA y en el mutante MPO209	110
Figura 21 Identificaciones de proteínas sobre las imágenes de los experimentos 2D-DIGE	113
Figura 22 Visualización de las proteínas de nueva síntesis en los geles radiactivos bidimensionales	123
Figura 23 Alineamiento de la proteína CdnL de <i>S. macroglotabida</i> TFA con las correspondientes de <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. smegmatis</i> y <i>M. xanthus</i>	137

Figura 24 Representación de <i>cdnL</i> en el cromosoma de TFA y en la construcción del plásmido pMPO1125	138
Figura 25 Southern Blot de ADN cromosómico de los candidatos de TFA con la integración de pMPO1125 en el cromosoma y de los candidatos Tc ^S y sac ^R	140
Figura 26 Esquemas de los plásmidos pMPO1129 y pMPO1140 para testar la funcionalidad del promotor <i>Psal</i> en TFA	141
Figura 27 Funcionamiento del promotor <i>Psal</i> en TFA	142
Figura 28 Esquemas de los plásmidos pMPO1130 y pMPO1141 para la generación de los mutantes condicionales de <i>cdnL</i> en TFA	143
Figura 29 Organización génica en TFA silvestre y en los mutantes condicionales esperados tras la integración de los plásmidos pMPO1130 o pMPO1141	144
Figura 30 Southern Blot de ADN cromosómico de TFA silvestre y del mutante $\Delta cbs::km$ (MPO816)	146
Figura 31 Curvas de crecimiento de TFA y del mutante Δcbs (MPO816)	147
Figura 32 Curvas de crecimiento y expresión de la fusión <i>thnC::lacZ</i> en TFA (TFA-1002), en MPO209 (MPO209-1002) y en el mutante MPO821 (MPO816-1002)	149
Figura 33 Curvas de crecimiento y expresión de la fusión <i>thnB::lacZ</i> en TFA (T1003) y en el mutante MPO822 (MPO816-1003)	150
Figura 34 RT-qPCR de los genes <i>thnB</i> (A) y <i>thnR</i> (B) tras el estímulo de represión catabólica en TFA y en el mutante MPO816	151
Figura 35 Alineamiento de las proteínas FixJ de TFA, AccR de <i>Azoarcus sp.</i> CIB y BphQ de <i>Acidovorax sp.</i> KKS102	153
Figura 36 Dominios de las proteínas FixJ, BphQ y AccR	154
Figura 37 Dominios de las proteínas FixL y BphP	155
Figura 38 Representación de los genes <i>fixL</i> y <i>fixJ</i> en TFA silvestre y en los mutantes MPO801, MPO803, MPO804, MPO808, MPO811 Y MPO812 de TFA	156
Figura 39 Crecimiento de TFA y de los mutantes en <i>fixL</i> , <i>fixJ</i>	158
Figura 40 Organización génica de los componentes del sistema PTS existentes en TFA	161
Figura 41 Alineamiento de las proteínas Hpr de TFA y <i>S. melilloti</i>	162
Figura 42 Alineamiento de las proteínas HprK de TFA y de <i>S. melilloti</i>	162
Figura 43 Alineamiento de la proteína HprK _{relA} de TFA con HPrK de <i>S. melilloti</i> y HPrK de <i>B. subtilis</i>	163
Figura 44 Representación de <i>hprK_{relA}</i> en TFA silvestre y en el mutante $\Delta hprK_{relA}$	164
Figura 45 Crecimiento de TFA y del mutante $\Delta hprK_{relA}$ en MM con tetralina o β -HB	165

Figura 46 Curvas de crecimiento y expresión de la fusión <i>thnC::lacZ</i> en TFA (TFA-1002), MPO209 (MPO209-1002) y el mutante MPO817 (MPO809-1002)	166
Figura 47 Curvas de crecimiento y expresión de la fusión <i>thnB::lacZ</i> en TFA (TFA-1003) y en el mutante MPO818 (MPO809-1003)	167
Figura 48 Expresión de los genes <i>thnB</i> y <i>thnR</i> tras el estímulo de represión catabólica en TFA y en el mutante MPO809	168
Figura 49 Representación de <i>hprK</i> en TFA silvestre y en el mutante $\Delta hprK$ (MPO824)	169
Figura 50 Crecimiento de TFA y del mutante $\Delta hprK$ en MM con tetralina o β -HB	170
Figura 51 Curvas de crecimiento y expresión de la fusión <i>thnC::lacZ</i> en TFA (TFA-1002) y en el mutante MPO825 (MPO824-1002)	171
Figura 52 Representación de la organización génica en TFA y en el mutante Δhpr	172
Figura 53 Crecimiento de TFA y del mutante Δhpr (MPO815) de en MM con tetralina	173
Figura 54 Crecimiento de TFA y del mutante Δhpr (MPO815) en MM con β -HB 40 mM, MM+tetralina+ β -HB 8 mM o MM+tetralina+ β -HB 40 mM	174
Figura 55 Crecimiento de TFA y del mutante Δhpr en MML o MM con ácido sebácico	175
Figura 56 Expresión del gen codificante de la subunidad α de la 3-oxoácido-CoA transferasa tras el estímulo de represión catabólica en TFA silvestre y en el mutante MPO815	177
Figura 57 Curvas de crecimiento y expresión de la fusión <i>thnC::lacZ</i> en TFA (TFA-1002), en MPO209 (MPO209-1002) y en el mutante MPO819 (MPO815-1002)	178
Figura 58 Curvas de crecimiento y expresión de la fusión <i>thnB::lacZ</i> en TFA (TFA-1003) y en el mutante MPO820 (MPO815-1003)	179
Figura 59 Expresión de los genes <i>thnB</i> y <i>thnR</i> tras el estímulo de represión catabólica en TFA silvestre y en el mutante MPO815	180
Figura 60 Producción de gránulos de PHB en TFA silvestre y en los mutantes MPO209 y MPO815 de TFA	183
Figura 61 Modelo propuesto de parte del metabolismo del carbono en TFA	196
Figura 62 Alineamiento de las proteínas CdnL de <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. macroglitabida</i> TFA y <i>T. Termophilus</i> mediante ClustalW	205
Figura 63 Modelo propuesto de implicación del sistema PTS en el fenómeno de represión catabólica	214

ABREVIATURAS

6-fenil-HODA	2-Hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato
A₄₂₀	densidad óptica medida a 420 nm
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
Ap	ampicilina
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosín trifosfato
β-HB	β-hidroxibutirato
Ci	curios
Cm	cloranfenicol
cpm	cuentas por minuto
DEPC	dietilpirocarbonato
DIGE	diferencia de fluorescencia en gel de electroforesis
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
DTT	ditiotreitól
DMSO	dimetil sulfóxido
D.O.₆₀₀	densidad óptica medida a 600 nm
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
Gm	gentamicina
HTH	hélice-giro-hélice (<i>helix-turn helix</i>)
IPTG	isopropil-b-D-tiogalactósido
Kb	kilobase
Km	kanamicina
kV	kilovoltio
LB	medio Luria-Bertani
min	minuto
MM	medio mínimo
MML	medio rico de crecimiento para TFA
NAD(P)H	nicotinamida-adenín-dinucleótido o dinucleótido fosfato reducida
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	par de bases
PCB	policlorobifenilos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polimerase chain reaction</i>)
PEP	fosfoenol-piruvato
PHB	polihidroxibutirato
PM	peso molecular
p/v	peso/volumen
RT-qPCR	PCR cuantitativa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
Str	estreptomicina
Tc	tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TFA	<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i> TFA
THN	tetralina
ufc	unidades formadoras de colonia
v/v	relación volumen/volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranósido

Las bacterias de vida libre son microorganismos asombrosamente versátiles. La variedad de capacidades metabólicas que poseen, posibilita que puedan emplear una gran diversidad de compuestos, naturales o producidos artificialmente por el hombre, como fuentes de carbono y energía. Esto facilita su adaptación a condiciones ambientales cambiantes y su supervivencia en los diferentes hábitats. Sin embargo, esa versatilidad metabólica no estaría asociada al mismo nivel de éxito si no estuviera sujeta a los procesos de regulación génica, globales y específicos, que funcionan de nexo entre los estímulos ambientales y el desarrollo de los procesos metabólicos, evitando gastos fútiles de energía. La regulación de la expresión génica supone, por tanto, una pieza imprescindible en la optimización de la eficiencia y la adaptación de las bacterias a su entorno.

1. Degradación de compuestos aromáticos y represión catabólica

Los compuestos aromáticos son, tras los carbohidratos, los compuestos orgánicos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Están, por ejemplo, presentes en todos los organismos vivos en forma de fenilalanina, tirosina y triptófano y llegan a constituir el 25 % de la biomasa vegetal (Fuchs *et al.*, 2011). Las plantas son, en efecto, la fuente principal de producción de compuestos aromáticos, ya que los generan como constituyentes elementales de la lignina y como metabolitos secundarios. Además de este tipo de producción natural, existe otra gran diversidad de compuestos aromáticos sintetizados artificialmente por el hombre, y relacionados con la industria farmacéutica, agrícola, alimentaria o química, que se libera continuamente al medio ambiente. El grupo BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), especialmente conocido, se genera en gran medida a partir de los derivados del petróleo como la gasolina (Fuchs *et al.*, 2011).

Los compuestos aromáticos artificialmente producidos por el hombre y los asociados al petróleo y sus derivados suponen en muchos casos un serio problema ambiental. En primer lugar, porque los compuestos aromáticos poseen una reactividad química limitada, lo que los hace estables y persistentes en los medios naturales (Fuchs *et al.*, 2011). En segundo lugar, porque aquellos que son industrialmente producidos suelen contener estructuras químicas completamente nuevas para los ecosistemas naturales. Finalmente, algunos de estos compuestos aromáticos (y sus mezclas) son liberados en

ingentes cantidades en las combustiones de fuel, la incineración de residuos o los accidentes relacionados con la industria del petróleo. Una vez presentes en los medios terrestres, acuáticos o aéreos, algunos compuestos aromáticos pueden llegar a resultar altamente tóxicos.

Afortunadamente, entre las capacidades metabólicas de muchas bacterias se incluye la de emplear los compuestos aromáticos con distintas funciones. En algunas bacterias anaeróbicas se emplean como aceptores finales de electrones (por ejemplo en la dehalorespiración) o como transportadores intermediarios de electrones para posibilitar el uso de aceptores inorgánicos finales (por ejemplo, óxidos de hierro insolubles en el medio) que de otra manera serían muy difíciles de emplear por las bacterias (Gibson *et al.*, 2002). Es, sin embargo, el uso de los compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía por parte de las bacterias aeróbicas o anaeróbicas (Gibson *et al.*, 2002, Seo *et al.*, 2009) el que produce mayor beneficio para la eliminación de estos contaminantes del medio ambiente, ya que pueden ser transformados en otros compuestos inocuos del metabolismo bacteriano o mineralizados completamente hasta CO₂ y agua (Alexander, 1999).

Hoy en día existen numerosos estudios, a nivel genético y bioquímico, sobre la degradación de un amplio abanico de compuestos aromáticos, siendo un ejemplo de esta diversidad los registros recogidos en la “Base de Datos de Biocatálisis y Biodegradación de Minnesota” (<http://umbbd.ethz.ch/>; Gao *et al.*, 2010).

Una de las características comunes para todas estas rutas de degradación de moléculas aromáticas es que están sujetas a sistemas de regulación de la expresión génica, que actúan a dos niveles distintos: el específico y el global. El primero está relacionado con la disponibilidad en el medio del sustrato de la ruta (o de un intermediario de su degradación) que, a través de reguladores transcripcionales específicos (generalmente activadores), promueve la inducción de los genes de degradación necesarios. El nivel de regulación global, sin embargo, responde a la disponibilidad de otras fuentes de carbono en el medio o a la situación metabólica y/o fisiológica global de las células (*hambre* de carbono, limitación de oxígeno, estrés ambiental, fase de crecimiento, etc.).

Uno de los sistemas globales de regulación más importante en bacterias es el causante del fenómeno de la represión catabólica, que establece un orden de prioridad en el consumo de las distintas fuentes de carbono que pudieran coexistir en el medio de cultivo. Este tipo de regulación permite a las células optimizar sus tasas de crecimiento (y

por tanto su competitividad y adaptación) en los ecosistemas naturales mediante la utilización, en primer lugar, de la fuente de carbono preferencial (la que puede metabolizarse más rápidamente), en detrimento de las demás (Moreno *et al.*, 2009). A nivel molecular, este sistema de control actúa impidiendo o disminuyendo la expresión de los genes necesarios para el uso o transporte de las fuentes de carbono no preferenciales y alterando la expresión de muchos otros genes (entre el 5 y el 10 % del total) relacionados con el metabolismo global (Blencke *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 2005).

Las moléculas aromáticas constituyen fuentes de carbono secundarias o no preferenciales para las bacterias, por lo que su metabolismo está sujeto a represión catabólica y queda generalmente supeditado al de otros compuestos más fácilmente metabolizables (azúcares, ácidos orgánicos o aminoácidos). Los procesos de regulación específica que intervienen en el ajuste de la expresión y actividad de estas rutas de degradación de compuestos aromáticos suelen conocerse con gran exactitud (Gerischer, 2002), pero se sabe muy poco sobre los procesos globales que intervienen en el mismo control.

Aún constituyendo la represión catabólica un proceso de regulación prácticamente universal en el mundo de las bacterias heterótrofas, la base molecular subyacente varía notablemente entre los distintos géneros, probablemente debido a las diferencias metabólicas globales y a la especialización ecológica de cada grupo bacteriano. Sin embargo, y a pesar de su indiscutible importancia, sólo en algunos casos como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas putida* el fenómeno de represión catabólica ha sido investigado con verdadera profundidad.

El entendimiento de este proceso tan complejo resulta de indudable relevancia no sólo para la comprensión completa de las rutas de degradación de compuestos aromáticos, sino para su potencial mejora con fines medioambientales y para el diseño de biocatalizadores o biosensores (Rojo, 2010). La represión catabólica constituye, adicionalmente, un hándicap importante en los procesos industriales de producción de metabolitos a partir de cultivos bacterianos, por lo que existen numerosas líneas de investigación enfocadas hacia su estudio y optimización (Vinuselvi *et al.*, 2012). Finalmente, este tipo de regulación global controla, en ciertas bacterias patógenas, la expresión de factores de virulencia (asociados en último término a la “búsqueda” de fuentes de carbono adicionales), sumando una razón más para justificar los esfuerzos por elucidar las bases moleculares de la represión catabólica (Gorke *et al.*, 2008).

2. Base molecular de la represión catabólica en las bacterias modelo

Como ya se ha comentado, los mecanismos moleculares que subyacen al fenómeno de represión catabólica son diversos, específicos de cada grupo bacteriano y en su mayor parte desconocidos. En este apartado se detallarán los casos mejor documentados entre diferentes bacterias modelo y también el caso de la α -proteobacteria *Shinorizhobium meliloti*.

2.1. Represión catabólica en *Escherichia coli*

En *E. coli*, los sustratos que inducen represión catabólica son los azúcares, (principalmente la glucosa) y el control sobre los genes catabólicos para el metabolismo de otros compuestos (por ejemplo lactosa) se ejerce impidiendo la activación transcripcional de esos genes. Las piezas claves de este sistema son el componente IIA (EIIA^{Glc} o Crr) del sistema PEP-PTS para el transporte específico de azúcares, la enzima adenilato ciclasa, el metabolito AMPc y el activador transcripcional CRP o CAP (de “cAMP receptor protein” o “catabolite gen-activator protein”) (Gorke *et al.*, 2008).

El sistema PEP-PTS (fosfoenolpiruvato fosfotransferasa) es un sistema multiproteico que acopla la fosforilación de los azúcares con su transporte a través de la membrana y que está compuesto por tres tipos de enzimas que llevan a cabo la cadena de fosforilaciones: la enzima I (EI), la proteína HPr y la enzima II (EII), formada esta última por los dominios A, B y C. En presencia de glucosa y algunos otros azúcares en el medio, el componente citosólico EI se autofosforila empleando fosfoenolpiruvato (PEP) como donador y, a continuación, transfiere dicho grupo fosfato a un residuo de histidina de la proteína (también soluble) HPr, que lo dona a su vez al dominio “IIA” (específico de sustrato) que forma parte de los transportadores EII. El grupo fosfato se transfiere del dominio “A” del transportador EII al dominio “B” y, de este último, directamente al azúcar, que así fosforilado, se transporta a través del dominio “C” de la membrana (Fig. 1).

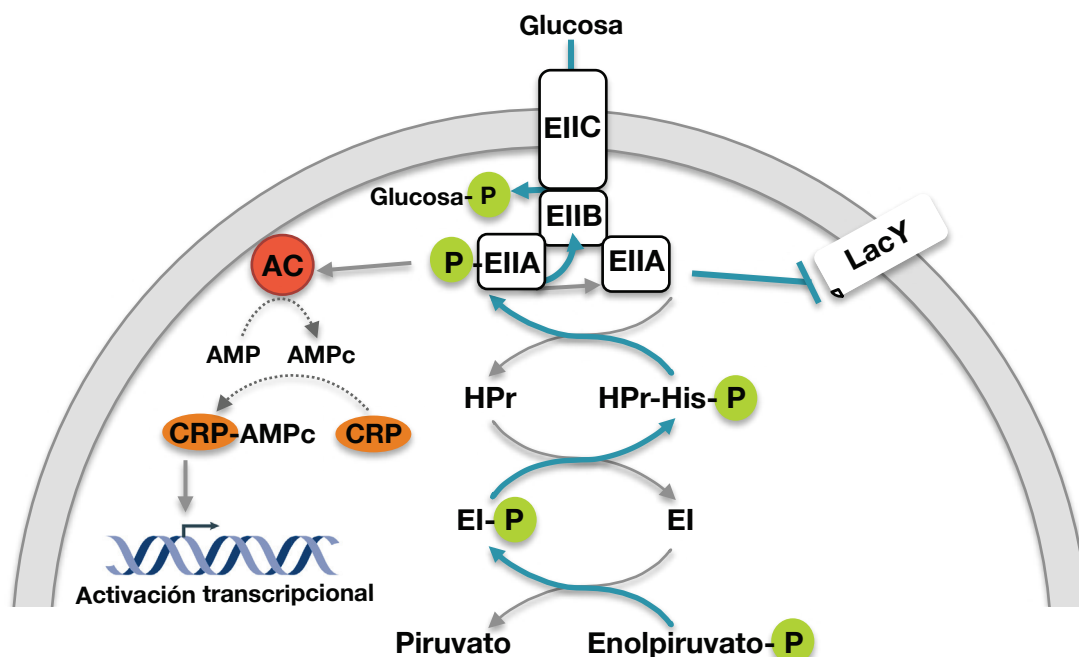


FIG. 1. Esquema del sistema PEP-PTS de *E. coli*. Se representa con flechas azules el sentido de actuación del sistema durante el transporte de azúcares. En presencia de altos niveles de glucosa el transporte de otros metabolitos es inhibido (se señala a modo de ejemplo el transportador de lactosa LacY). Para la expresión de genes implicados en el metabolismo de fuentes de carbono no preferenciales resulta imprescindible la presencia del inductor de la ruta (lactosa) y la activación por CRP en presencia de AMPc (producido por la enzima adenilato ciclasa -AC-).

En el fenómeno de represión catabólica de *E. coli*, es fundamental el estado de fosforilación del componente EIIA. Para la expresión de los genes catabólicos de fuentes de carbono no preferenciales (por ejemplo la lactosa), es imprescindible que EIIA fosforilada active a la enzima adenilato ciclasa, que genera cAMP. Este metabolito se une a la proteína CRP, que solo entonces promueve la unión de la ARN polimerasa a los promotores o facilita la formación del complejo abierto, actuando así como activador de los genes y operones catabólicos (por ejemplo el operón *lac* para el uso de lactosa) para el uso de fuentes de carbono distintas a los “azúcares PTS” (Tagami *et al.*, 1998).

En presencia de glucosa o de otros azúcares PTS, el componente EIIA se encuentra mayoritariamente desfosforilado a causa de la transferencia del grupo fosfato hasta el azúcar transportado. Sin embargo, se ha demostrado que el estado de fosforilación de EIIA no solo depende del transporte a través de PTS, sino de la relación piruvato:PEP presente en la célula. Si la cantidad de piruvato es alta con respecto a la de PEP, el componente EIIA se encontrará mayoritariamente desfosforilado, y viceversa (Hogema *et al.*, 1998). Eso

explica que el componente EIIA se encuentre mayoritariamente desfosforilado no sólo cuando *E.coli* se cultiva en presencia de azúcares PTS (glucosa o manitol), sino también cuando las fuentes de carbono que tiene disponible (glucosa-6-fosfato, lactosa o melobiosa, por ejemplo), a pesar de acceder a la célula a través de transportadores alternativos, son fácilmente metabolizables hasta piruvato e incrementan la relación piruvato:PEP (Hogema *et al.*, 1998).

Tradicionalmente, se pensaba que el uso en *E.coli* de azúcares PTS (como la glucosa) generaría una mayoría de EIIA desfosforilada y, por tanto, bajos niveles de AMPc y de expresión de los operones catabólicos alternativos (p.ej., el operón *lac*). Alternativamente, el uso de azúcares no preferenciales (p.ej., lactosa) provocaría una mayoría de EIIA fosforilada (debido a la ausencia de transporte PTS), altos niveles de AMPc e incremento de la activación mediada por CRP. Sin embargo, se ha demostrado que el porcentaje de EIIA desfosforilada es muy similar en presencia de azúcares que se transportan (manitol, fructosa) o no (lactosa, melobiosa) a través de PTS (Hogema *et al.*, 1998) y, además, que los niveles de AMPc no siempre cumplen una relación directa con los niveles de fosforilación de EIIA ni con el tipo de transporte de los azúcares. Así, las células poseen concentraciones menores de AMPc en presencia de glucosa-6-fosfato que en presencia de glucosa y, en presencia de gluconato, los niveles de AMPc son casi idénticos a los característicos del crecimiento en glucosa, pero EIIA permanece mayoritariamente fosforilada (Hogema *et al.*, 1997).

La represión de los operones catabólicos (p.ej. el operón *lac*) no está, por tanto, principalmente dirigida por los niveles de AMPc, ya que niveles de este metabolito similarmente bajos a los registrados en presencia de glucosa aún permiten la activación mediada por CRP (Inada *et al.*, 1996). En su lugar, cobra gran importancia el mecanismo de “exclusión del inductor” mediado por EIIA desfosforilada. En ese estado, EIIA interacciona, entre otros, con el transportador LacY y lo inactiva, impidiendo la entrada de lactosa. Puesto que la lactosa funciona como inductor de su propia ruta de degradación, la interrupción de su transporte implica una represión de los genes *lac* (Inada *et al.*, 1996). Este mecanismo de “exclusión del inductor” es también aplicable al metabolismo de la maltosa, melobiosa, rafinosa y galactosa (Misko *et al.*, 1987, Titgemeyer *et al.*, 1994). La importancia del complejo AMPc-CRP no es, sin embargo, inexistente, ya que se requiere para la expresión de los genes catabólicos y, además, contribuye a la represión catabólica a través de la activación de la expresión de los genes para los componentes EIIB y EIIC del

transportador de glucosa (potenciando su entrada en la célula si fuera posible) (Kimata *et al.*, 1997).

Finalmente, el complejo AMPc-CRP no sólo regula la expresión de genes codificantes de proteínas, sino también genes que codifican para pequeños ARN reguladores, como es el caso de CyaR o Spot42 (De Lay *et al.*, 2009, Polayes *et al.*, 1988). Spot42 está implicado en la regulación de la expresión de genes necesarios para el metabolismo primario y secundario, el balance redox y el consumo de diversas fuentes de carbono no preferenciales (Beisel *et al.*, 2011). Por su lado, CyaR es un pequeño ARN que se une a la proteína Hfq y que regula post-transcripcionalmente la expresión de una variedad de genes.

2.2. Represión catabólica en *Bacillus subtilis*

En la Gram-positiva *B. subtilis*, la glucosa también constituye la fuente de carbono preferencial, generando la respuesta de represión catabólica en las células a través del sistema PEP-PTS. En este caso, el control sobre los genes catabólicos para otros compuestos se ejerce mediante un mecanismo de represión transcripcional de esos genes. En *B. subtilis*, los elementos clave de todo el proceso son los intermediarios glucolíticos fructosa-1,6-bisfosfato y glucosa-6-fosfato, la proteína HPr del sistema PTS y el represor transcripcional CcpA (de “catabolite control protein A”) (Fig. 2).

En esta bacteria, la proteína Hpr puede ser fosforilada en dos residuos distintos: en la histidina-15, mediante la actuación de El (al igual que en *E. coli*) o en la serina-46 gracias a la interacción con la quinasa/fosforilasa HPrK. La fosforilación en la histidina es parte de la cadena de transferencia de fosfatos hasta el componente EII y finalmente el azúcar transportado. La fosforilación en la serina, sin embargo, tiene una función puramente reguladora, ya que desencadena la respuesta de represión catabólica.

En situación de limitación de carbono, las células acumulan fosfato inorgánico, que potencia la actividad fosforilasa de la proteína HprK sobre HPr-Ser₄₆-P (Mijakovic *et al.*, 2002). La disminución de HPr fosforilada en la serina relaja el proceso de represión catabólica y permite una mayor fosforilación de la misma proteína en la histidina-15 para el transporte de azúcares mediado por el sistema PTS.

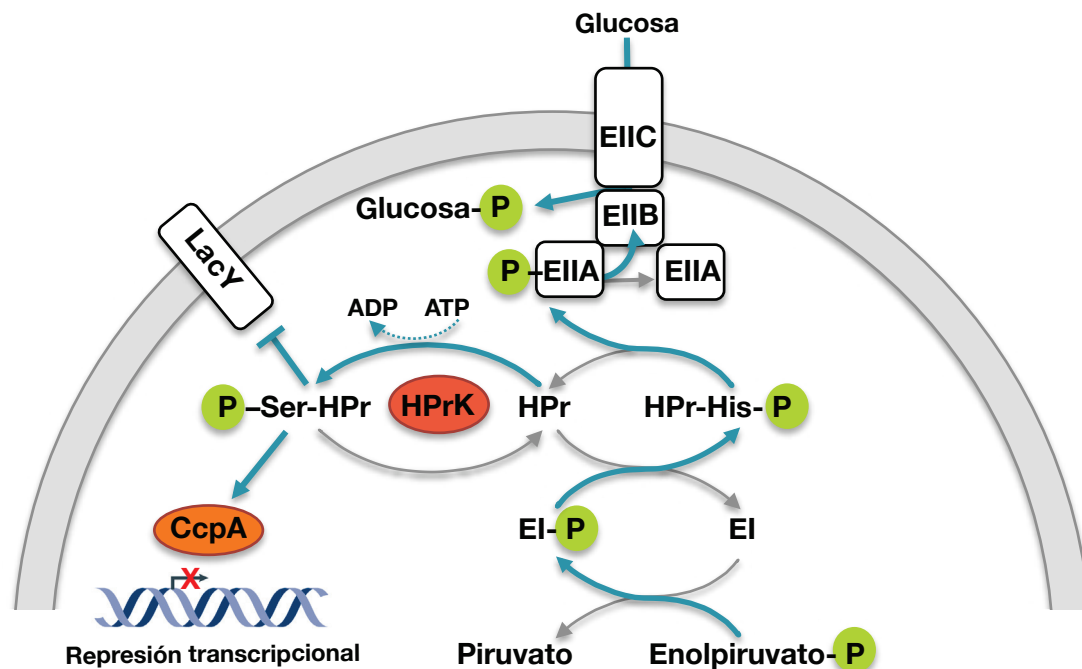


FIG. 2. Esquema del sistema PEP-PTS de *B. subtilis*. Se representa con flechas azules el sentido de actuación del sistema durante el transporte de azúcares. En presencia de altos niveles de glucosa, la proteína HPrK fosforila a HPr en su residuo de serina, estado que desencadena el proceso de represión catabólica. El regulador transcripcional CcpA juega un papel fundamental en la represión de genes para el metabolismo de fuentes de carbono secundarias.

Por el contrario, tras la entrada de glucosa en las células y su metabolización, se produce fructosa-1,6-bisfosfato, que potencia la actividad quinasa de HPrK, dando lugar a la fosforilación de HPr en el residuo de serina (Jault *et al.*, 2000, Reizer *et al.*, 1998). En este estado, la proteína HPr-Ser₄₆-P interacciona con el regulador CcpA, actuando como cofactor y promoviendo su unión a los promotores de los genes catabólicos regulados, cuya expresión queda reprimida (Figura 02). La interacción entre HPr-Ser₄₆-P y CcpA se ve potenciada por la unión de los metabolitos glicolíticos fructosa-1,6-bisfosfato y glucosa-6-fosfato (Schumacher *et al.*, 2007). El regulador CcpA se une a operadores palindrómicos en los promotores génicos llamados sitios *cre* ("catabolite responsive elements"). Generalmente, estos sitios se localizan en las regiones de inicio de la transcripción o superpuestos a las secuencias consenso de los promotores (Miwa *et al.*, 2000). En algunos casos, sin embargo, los sitios *cre* pueden ubicarse mucho más aguas abajo, bloqueando en ese caso el avance de la ARN polimerasa (como ocurre en el gen *sigL* para σ^L ; Choi *et al.*, 2005). También pueden encontrarse sitios *cre* aguas arriba del promotor, actuando la

proteína CcpA como activador de la transcripción en lugar de como represor. Un ejemplo de este último caso son los genes *ackA* y *pta*, cuyos productos proteicos están implicados en la excreción de acetato cuando las células crecen en exceso de carbono (Grundy *et al.*, 1993).

Además del control ejercido por CcpA a través de la unión directa a los sitios *cre*, existen algunos ejemplos de regulación indirecta mediada por CcpA (Blencke *et al.*, 2003). Es el caso de algunos genes que se inducen en presencia de glucosa, por ejemplo aquellos del operón glicolítico *gap* (implicado en la producción de PEP a partir de gliceraldehído-3-fosfato). Se sabe, en este caso, que la delección del gen para CcpA genera una sobre-actividad de HPrK en su modalidad de quinasa, produciéndose una acumulación de HPr fosforilada en la serina. La ausencia de Hpr fosforilada en el residuo de histidina impide el transporte de azúcares a través del sistema PTS, lo que acaba en último término afectando a la expresión de numerosos operones (como el operón *gap*) que dependen de la inducción por glucosa (Ludwig *et al.*, 2002).

Finalmente, existen también algunos casos descritos de represión catabólica en *B. subtilis* donde simultánea pero independientemente de la actuación de CcpA, el proceso de “exclusión del inductor” juega un papel fundamental. Por ejemplo, en la regulación de la expresión del operón *glpFK* (para el transporte y la fosforilación del glicerol) se conoce que la proteína HPr-His₁₅-P promueve la fosforilación (y por tanto la actividad) de GlpK, la quinasa necesaria para la producción de glicerol-3P (el inductor del operón). En presencia de glucosa, la fosforilación de GlpK mediada por HPr-His₁₅-P no ocurre, impidiendo la expresión del operón *glpFK* y, por tanto, el transporte de glicerol al interior celular (Darbon *et al.*, 2002).

2.3. Represión catabólica en el género *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* es conocido por la variedad de nichos que ocupa (animales, plantas, medios acuáticos y terrestres) y por su capacidad de metabolización de gran variedad de compuestos aromáticos (fenol, tolueno, xileno, ácido fenilacético, quinoleína o naftaleno).

La base molecular de la represión catabólica en este género difiere sustancialmente de la conocida para enterobacterias o para *B. subtilis*. La primera gran diferencia es la

jerarquía establecida en el uso de las distintas fuentes de carbono: las bacterias de este género emplean preferencialmente ciertos ácidos orgánicos (succinato, piruvato, acetato...) o amino ácidos en lugar de glucosa, aunque este último compuesto sí ejerce represión catabólica sobre el uso de hidrocarburos. No obstante, existen algunas excepciones en este orden de preferencias. La cepa CSV86 de *P. putida*, por ejemplo, metaboliza naftaleno en primer lugar aún en presencia de glucosa (Basu *et al.*, 2006). Por otro lado, se sabe que el sistema PTS clásico de transporte de azúcares no es una pieza clave en el desarrollo de la respuesta de represión catabólica. De hecho, el único azúcar transportado a través de este sistema en *Pseudomonas* es la fructosa, que no juega ningún papel importante en represión catabólica (Velazquez *et al.*, 2007). Finalmente, aunque existen dentro de este género muchas especies con proteínas altamente similares a la proteína CRP de *E. coli*, sólo se ha podido demostrar para algunos casos (como el de *P. putida*) un papel global en la asimilación de ciertos compuestos y en la regulación del metabolismo del carbono y el nitrógeno (Daniels *et al.*, 2010, Milanesio *et al.*, 2011) pero no se ha podido confirmar ninguna función en el fenómeno de represión catabólica.

Hasta la fecha, los elementos implicados en represión catabólica en *Pseudomonas* que se conocen son el regulador Crc (cuya actividad está a su vez controlada por las proteínas CbrA y CbrB de manera indirecta, por el pequeño ARN *crcZ* y, en algunas estirpes, también por el pequeño ARN *crcY*), la oxidasa terminal Cyd y el sistema PTS^{Ntr} (homólogo al sistema clásico PTS).

El regulador Crc es una proteína con un papel fundamental en el control del transporte y metabolismo de aminoácidos y azúcares (Moreno *et al.*, 2009), resultando imprescindible en la organización global del metabolismo. En algunas estirpes se ha demostrado, además, su implicación en movilidad y en la formación de biofilm (O'Toole *et al.*, 2000). El mecanismo de actuación de Crc (Fig. 3, adaptado de Moreno *et al.*, 2012) consiste en la regulación post-transcripcional de los genes a través de la interacción con los ARN mensajeros. Muy recientemente ha podido demostrarse que dicha interacción no es directa, sino que requiere de la formación de un complejo ribonucleoproteico en el que es fundamental la presencia de la proteína Hfq de unión a ARN (Moreno *et al.*, 2014). Al unirse ambas proteínas a zonas ricas en CA del extremo 5' de los ARNm, se imposibilita la formación del complejo ternario 30S-MetARNt-ARN, evitando el inicio de la traducción. En varias estirpes de *Pseudomonas* (Moreno *et al.*, 2012, Filiatrault *et al.*, 2013) se ha confirmado que la regulación de Crc depende de un pequeño ARN, *crcZ* (y en el caso de *P. putida* del también pequeño ARN *crcY*) que secuestra a Crc en condiciones de no represión

catabólica. Esta interacción depende, nuevamente, de la mediación de Hfq (Moreno *et al.*, 2014). A su vez, la expresión de estos pequeños ARN se induce gracias a la proteína CbrB del sistema de dos componentes CbrA-CbrB (pieza clave de la regulación global del metabolismo) y está de alguna manera controlada por el propio Crc (Garcia-Maurino *et al.*, 2013).

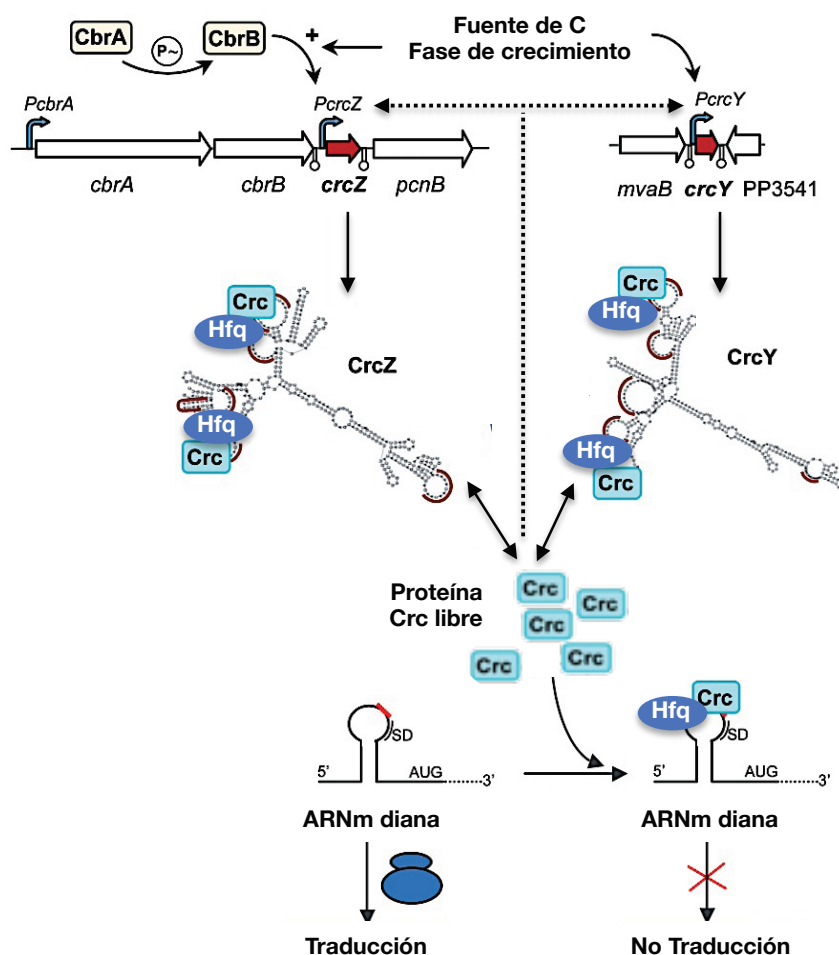


FIG. 3. Represión catabólica mediada por el regulador Crc en *P. putida*. El regulador post-transcripcional Crc forma, junto a Hfq, un complejo ribonucleoproteico con los ARNm, impidiendo su traducción. Los pequeños ARNs CrcY y CrcZ secuestran a Crc en condiciones de no represión catabólica. A su vez, la expresión de estos pequeños ARNs depende del sistema de dos componentes CbrAB y de la regulación indirecta mediada por el propio Crc.

Además del control por Crc, en *P. putida* ha podido demostrarse la participación de una ubiquinol oxidasa terminal de la cadena de transporte de electrones, denominada Cyo, en el proceso de represión catabólica asociado a la degradación de fenol (Petruschka *et al.*,

2001) y de alcanos (Dinamarca *et al.*, 2002). La inactivación de esa oxidasa, pero no la de cualquiera de las otras 4 oxidasas terminales que posee *P. putida*, atenúa el nivel de represión catabólica en presencia de succinato o aminoácidos. Hasta la fecha, se desconoce cómo Cyd consigue regular la expresión de ciertas rutas metabólicas, transportadores, reguladores transcripcionales y otros componentes de la cadena de transporte de electrones (Morales *et al.*, 2006), pero sin duda supone un mecanismo clave en la detección del estado energético de la célula gracias a la monitorización del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria.

Finalmente, existe en muchas bacterias (incluida *E. coli*) un sistema homólogo al sistema clásico PTS que carece de los componentes de membrana asociados al transporte de azúcares y que fue denominado PTS^{Ntr} por su descubrimiento inicial en relación con la asimilación de nitrógeno en *Klebsiella pneumoniae* (Merrick *et al.*, 1989, Reizer *et al.*, 1992). Este sistema, compuesto por las proteínas PtsP, PtsO (o NPr) y PtsN, homólogas a EI, HPr y EII, respectivamente, está implicado en la comunicación entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno. En *P. putida*, se ha podido demostrar la implicación de este sistema PTS^{Ntr} en el fenómeno de represión catabólica asociado a la degradación de tolueno y de xileno en presencia de glucosa o succinato. La inducción de esta ruta (controlada por el promotor Pu) se produce en presencia de sus sustratos y gracias a la activación mediada por el regulador XylR, pero su expresión está supeditada a la presencia en el medio de las otras fuentes de carbono. Se sabe que la inactivación de *ptsN* produce una relajación en el fenómeno de represión catabólica sin llegar a afectar al consumo de glucosa (Cases *et al.*, 1999), mientras que la de *ptsO* genera el efecto contrario, reprimiéndose el catabolismo de tolueno incluso en ausencia de glucosa. Las mutaciones dobles en *ptsN* y *ptsO* tienen el mismo efecto que la de *ptsN* (Cases *et al.*, 2001). Se conoce, además, que es la forma desfosforilada de PtsN (en su His-68) la implicada en represión catabólica y que otro residuo de histidina en PtsO es fundamental en su función. Todo esto sugiere que entre estos homólogos del sistema PTS se establece también una cadena de transporte de fosfatos, que ha sido demostrada en *E. coli* (Rabus *et al.*, 1999), aunque se desconoce con exactitud el modo de acción y la conexión entre la proteína PtsN y la ruta de degradación de tolueno.

2.4. Represión catabólica en *Shinorhizobium meliloti*

S. meliloti es una α -proteobacteria presente en los suelos como bacteria de vida libre o como simbiote de ciertas leguminosas para las que actúa como fijadora de nitrógeno.

Las fuentes de carbono preferencialmente empleadas por esta bacteria son los ácidos dicarboxílicos de 4 átomos de carbonos, principalmente el succinato, en detrimento de los azúcares como la glucosa, fructosa, rafinosa o lactosa. En presencia simultánea de estos dos tipos de fuentes de carbono, los cultivos bacterianos de *S. meliloti* manifiestan un crecimiento diáuxico generado por el uso del ácido dicarboxílico en primer lugar y por la asimilación del azúcar tras agotarse el primero en el medio. Entre ambas fases con tasas de crecimiento diferenciadas, se establece una fase *lag* de ausencia de crecimiento neto provocada por los cambios metabólicos y fisiológicos necesarios para la adaptación al uso de la segunda fuente de carbono. Es durante la fase *lag* cuando la represión catabólica de ciertas rutas se relaja para permitir el uso de los nutrientes secundarios. Las curvas de diauxia son, por tanto, un reflejo directo de este sistema de control global y permiten una fácil identificación de sus alteraciones.

A diferencia de los grupos bacterianos ya descritos, *S. meliloti* carece de un sistema PTS de transporte de azúcares completo. En su lugar, posee un sistema PTS de tipo Ntr compuesto por las proteínas EI^{Ntr} (gen *smc02437*), Hpr (gen *smc02754*) y EII^{Ntr} (gen *smc01141*). Adicionalmente, existe en el cromosoma de esta bacteria el gen para una proteína HprK (gen *smc02752*) y para una proteína $EIIA^{Man}$ o ManX (gen *smc02753*). Los genes para HprK, $EIIA^{Man}$ y HPr están organizados de manera consecutiva en el genoma, solapando el extremo 3' de la secuencia codificante de $EIIA^{Man}$ con el inicio de HPr (Fig. 4).



FIG. 4. Organización de los genes *hprK*, *EIIA* y *hpr* en el cromosoma de *S. meliloti*. Los genes adyacentes codifican para una PEP-carboxiquinasa (*pckA*), el regulador transcripcional ChvL y la quinasa sensora ChvG de un sistema de dos componentes y una S-adenosil-homocisteína hidrolasa (*achY*).

Para *S. meliloti*, se ha demostrado la implicación de estos componentes PTS en el proceso de represión catabólica de los genes catabólicos de rafinosa (*agp*) y de lactosa (*lac*) (Pinedo *et al.*, 2008, Pinedo *et al.*, 2009). Se sabe, además, que parte del efecto de represión catabólica es debido a los procesos de exclusión o expulsión de los inductores (Bringhurst *et al.*, 2002).

Aunque se desconoce la señal “ambiental” exacta que desencadena los cambios en los componentes PTS, así como la conexión entre este sistema y la regulación final de las rutas catabólicas, se sabe que entre los componentes EI^{Ntr}, HPr y EIIA^{Man} se establece una cadena de transporte de fosfatos que acaba controlando la expresión de las rutas de metabolización de los α - y β -galactósidos (Fig. 5).

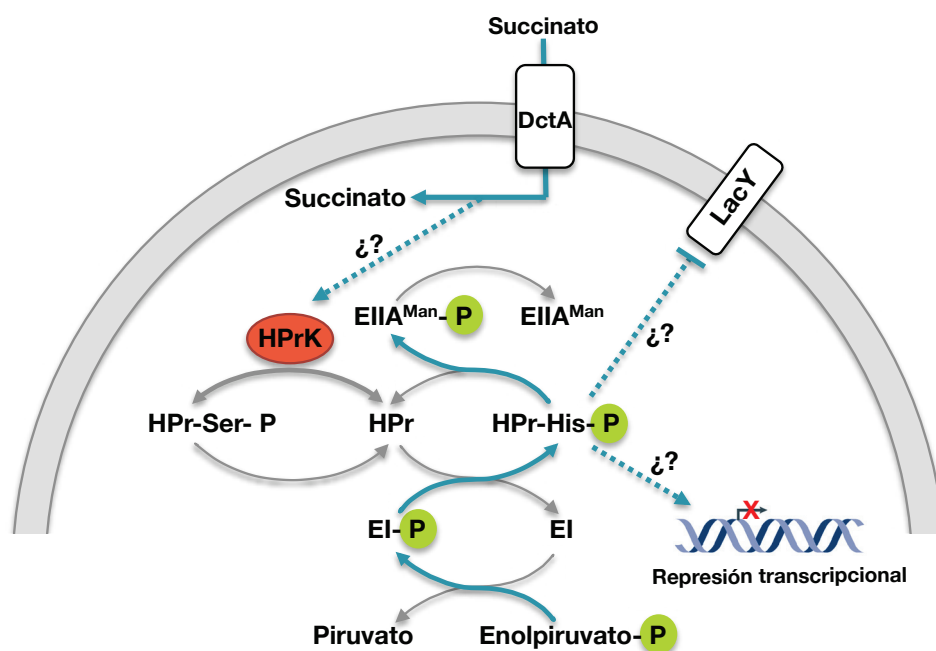


FIG. 5. Modelo del sistema PTS^{Ntr} de *S. meliloti*. Se representa la transferencia de grupos fosfato desde el fosfoenolpiruvato hasta el componente EIIA. El fenómeno de represión catabólica está desencadenado por el estado fosforilado de HPr en su residuo de histidina. Se desconoce el mecanismo exacto a través del cual HPr-His-P regula la expresión génica o el transporte de otras fuentes de carbono. La quinasa HPrK también juega un papel fundamental, promoviendo la fosforilación de HPr en su residuo de serina.

La cadena de fosforilaciones se produce desde la molécula de fosfoenolpiruvato hasta EI^A^{Man} a través de EI^{Ntr} y HPr, teniendo este sistema varios parecidos con aquel de *B. subtilis*: en primer lugar, la existencia de una proteína HPrK que posibilita que HPr pueda ser alternativamente fosforilada en su residuo de histidina-22 por EI^{Ntr} o en su serina-53 por HPrK; además, el estado de fosforilación de la proteína HPr es la pieza clave del sistema, siendo su forma fosforilada en la histidina (en *B. subtilis* es en la serina) la que desencadena el proceso de represión catabólica. Se asume que la función de HPrK es la de disminuir la fosforilación en la His-22 por EI^{Ntr}, ya que está descrito que el residuo de serina es importante para la interacción entre HPr y EI (Deutscher *et al.*, 2006).

En este sistema, los mutantes de delección en HPrK generan una respuesta de represión catabólica más acusada de lo normal en presencia de succinato y lactosa o rafinosa, reflejada en un aumento de la fase *lag* durante el crecimiento diáuxico y una disminución de la expresión de los genes *agp* y *lac*. Estos mutantes muestran, además, un crecimiento deficiente en varias fuentes de carbono distintas (succinato, fructosa, lactosa, rafinosa, glucosa o glicerol), aunque no en medio rico, y una inducción de los genes *lac* o *agp* muy por debajo de lo normal incluso en presencia de lactosa o rafinosa como únicas fuentes de carbono. El mismo fenotipo se manifiesta en mutantes de HPr en los que la Ser-53 se sustituye por una alanina, sugiriendo que es la acumulación de HPr fosforilada en la His-22 la responsable de estos fenotipos. Los autores proponen, por tanto, que la proteína HPrK de *S. meliloti* debe estar involucrada en la regulación del metabolismo del carbono a través del control de los genes o enzimas necesarios para el transporte y catabolismo.

Por el contrario, los mutantes de delección en HPr o aquellos en los que se sustituye la His-22 por una alanina, muestran una disminución en la intensidad (no una eliminación total) de la represión catabólica y una deficiencia en el crecimiento a base sólo de algunos nutrientes (rafinosa o maltosa). Los mutantes de delección doble en *hprK* y *hpr* muestran el mismo fenotipo que los simples en *hpr*.

Finalmente, los mutantes de delección para el componente EI^A^{Man} muestran unos niveles de expresión de los genes *agp* y *lac* por debajo de lo normal en condiciones de inducción de esos genes (crecimiento a expensas de rafinosa o lactosa únicamente), pero ninguna alteración en la represión de la expresión al simultanear las mismas fuentes de carbono con succinato. Además, el crecimiento de esta estirpe está afectado en todas las fuentes de carbono e incluso en medio rico. Los mutantes de delección doble para EI^A^{Man} y HPr muestran el mismo fenotipo que los simples en HPr. Los autores sostienen, sin

embargo, que los fenotipos observados en el mutante carente de $EIIA^{Man}$ no están causados por la ausencia de ninguna de sus formas (fosforilada o desfosforilada), ya que tanto el mutante simple en HPr (que debería carecer de la forma fosforilada de $EIIA^{Man}$) como el doble en HPr y $EIIA^{Man}$ (que debe carecer de ambas) sí expresan correctamente los genes catabólicos en condiciones de inducción, a diferencia de lo que ocurre en el mutante de $EIIA^{Man}$. Los autores especulan, por tanto, que la serie de fenotipos de este último mutante puede ser debida al efecto causado sobre HPr.

Otro estudio muy reciente (Goodwin *et al.*, 2014) que caracteriza bioquímicamente la transferencia de fosfatos desde el PEP hasta HPr a través de EI^{Ntr} demuestra, también, que la actividad de la proteína EI^{Ntr} de *S. meliloti* se inhibe fuertemente en presencia de glutamina y que este efecto es consecuencia de la interacción del aminoácido con el dominio GAF de EI^{Ntr} . Se presume, por tanto, que la proteína HPr se regula a través de señales que provienen tanto del metabolismo del carbono (a través de la relación [piruvato]: [PEP]) como del metabolismo del nitrógeno (por mediación de moléculas como la glutamina).

Además del control a través del sistema PTS, existe en *S. meliloti* un sistema de dos componentes que también interviene en la represión catabólica mediada por succinato (Garcia *et al.*, 2010). Este sistema, codificado en uno de los megaplásmidos de *S. meliloti*, está compuesto por las proteínas Sma0113 y Sma0114. Sma0113 es una histidina quinasa con un dominio HWE (caracterizado por la conservación de los residuos de histidina, triptófano y glutámico) y cinco dominios PAS (generalmente implicados en la detección de señales). Sma0114 es un regulador de respuesta tipo CheY que carece de dominio de unión a ADN.

Se ha demostrado que los mutantes simples carentes de la histidina quinasa o los dobles, carentes de la misma proteína y del regulador de respuesta, manifiestan un fenotipo de relajación del fenómeno de represión catabólica. En presencia únicamente de lactosa, estas estirpes inducen los genes *lac* en paralelo a la estirpe silvestre, pero, a diferencia de esta última, mantienen un alto nivel de expresión incluso llegada la fase estacionaria. En presencia de succinato y lactosa, los mutantes de delección en *sma0113* son capaces de empezar a inducir los genes *lac* antes de lo que es común en el silvestre.

Curiosamente, la delección en *sma0114* no tiene ningún efecto en represión catabólica. Sin embargo, ambos genes forman un aparente operón y el fenotipo del

mutante en *sma0114* (superproducción de gránulos de poli- β -hidroxibutirato) sí depende de que se mantenga intacta la presencia del gen *sma0113* silvestre.

Finalmente, los autores han analizado la posible relación epistática entre Sma0113 y HPr. Empleando un doble mutante carente de Sma0113 y con la mutación HPr-S53A, demostraron que el fenotipo obtenido es similar al de la mutación simple HPr-S53A y que, por tanto, la actuación de HPr debe producirse “aguas abajo” de la de Sma0113 en el proceso de represión catabólica.

3. Reguladores transcripcionales implicados en represión catabólica de rutas de degradación de compuestos aromáticos

Existe un gran número de reguladores transcripcionales (en su mayoría activadores) implicados en las rutas de degradación de compuestos aromáticos (Gerischer, 2002). Sin embargo, apenas se conocen algunos casos de reguladores transcripcionales directamente implicados en represión catabólica de las rutas de degradación de aromáticos. En este apartado se describirán dos casos concretos en β -proteobacterias y uno en actinomicetos.

3.1. El regulador BphQ en *Acidovorax* sp

Acidovorax sp. KKS102 es una bacteria del suelo, Gram-negativa, de la clase de las β -proteobacterias, capaz de degradar bifenilos y PCB. Los genes necesarios para esta función están organizados en el operón *bph* (*bphEGFA1A2A3BCDA4R*) y se transcriben desde el promotor pE. La expresión de este operón está modulada por la actividad de un regulador negativo (BphS) que impide la transcripción de los genes en ausencia de bifenilo (Ohtsubo *et al.*, 2001).

Además, el promotor pE está sujeto a represión catabólica cuando el medio de cultivo contiene succinato, fumarato o acetato. En este caso, la molécula responsable de dicho tipo control es la proteína BphQ, un activador transcripcional similar a los reguladores de respuesta que forman parte de sistemas de dos componentes junto con una quinasa sensora (Ohtsubo *et al.*, 2006). El gen que codifica para BphQ en *Acidovorax* sp. KKS102

está, en efecto, aguas abajo de otro que codifica para una quinasa sensora llamada BphP y cuyo codón de parada de la traducción está superpuesto al codón de inicio de *bphQ*. Sin embargo, a pesar de haberse demostrado en esta bacteria que el regulador BphQ es esencial para el fenómeno de represión catabólica y que es capaz de interactuar de manera directa con el promotor pE, no ha podido demostrarse ninguna implicación de la quinasa BphP en el mismo proceso. Se desconoce, por tanto, qué señal o qué otra proteína promueve la actividad de BphQ.

3.2. El regulador AccR en *Azoarcus* sp. CIB

Azoarcus sp. CIB es otra β -proteobacteria denitrificante capaz de degradar compuestos aromáticos de manera aeróbica y anaeróbica. Los genes que dirigen el metabolismo anaeróbico del benzoato están agrupados en el operón *bzd*. El promotor de este operón está regulado por el represor BzdR (únicamente inactivo en presencia del inductor benzoil-CoA), el activador transcripcional AcpR (regulado por los niveles de oxígeno) y otro represor, parálogo de BzdR: BoxR. Adicionalmente, el promotor de la ruta de degradación de benzoato está sujeto a represión catabólica en condiciones de anerobiosis y en presencia de ácidos orgánicos como el succinato, malato o acetato. En ese caso, el regulador responsable del fenómeno de represión catabólica es el represor AccR, que comparte un 47% de identidad con el regulador BphQ de *Acidovorax* y que pertenece a los reguladores de respuesta de la familia FixJ/NarL. Se ha demostrado, además, que AccR no sólo ejerce represión catabólica sobre la ruta de metabolización de benzoato, sino también sobre la de degradación de 3-metilbenzoato y 3-hidroxibenzoato, siempre en condiciones de anaerobiosis. En cuanto a la estructura de este represor, merece la pena destacar que posee 2 dominios diferenciados cuya función ha sido determinada: un dominio REC que se fosforila y desfosforila afectando al estado de multimerización de la proteína y un dominio HTH de unión al ADN que reconoce una secuencia específica en los promotores regulados (Valderrama *et al.*, 2013).

3.3. El regulador tipo CRP en *Rhodococcus* sp. TFB

Rhodococcus sp. TFB es una bacteria Gram-positiva, aislada del río Rin en paralelo a la bacteria de estudio de esta Tesis. TFB es capaz de emplear como fuente de carbono y

energía una cierta variedad de compuestos aromáticos: tetralina, ftalato, naftaleno y fenantreno (Tomas-Gallardo *et al.*, 2006).

La ruta de degradación de tetralina en esta bacteria pudo ser identificada mediante técnicas de genética reversa (Tomas-Gallardo *et al.*, 2009). Se sabe que está codificada por dos operones estructurales que se expresan en la misma dirección del ADN y por un operón regulador divergente que codifica para un sistema de dos componentes (compuesto por ThnS y ThnT). La ruta de degradación en TFB es inducible por tetralina (presumiblemente a través de la regulación positiva demostrada de ThnST) y está sujeta a represión catabólica por glucosa (fenómeno ausente, sin embargo, en la ruta de degradación de ftalato).

El mecanismo molecular que subyace a la represión catabólica de los genes de degradación de tetralina está parcialmente caracterizado en TFB (Tomas-Gallardo *et al.*, 2012), siendo este el único caso descrito en la bibliografía.

Mediante mutagénesis de un sitio similar al sitio CRP de *E.coli* en las zonas promotoras de los operones estructural y regulador pudo saberse que efectivamente, dichas secuencias en *cis* son imprescindibles para posibilitar la represión catabólica. Además, ensayos de afinidad *in vitro* demostraron que existe en TFB una proteína homóloga a los reguladores transcripcionales de la familia CRP-FNR que interacciona con aquellas secuencias reguladoras en *cis*, tanto en el promotor del operón estructural como en el promotor del operón regulador. De esta manera, las mutaciones en las secuencias CRP del promotor estructural no permiten una desrepresión total debido a la represión aún existente en el promotor silvestre del operón regulador (cuyos productos génicos tienen un efecto positivo sobre la expresión de los genes de degradación de tetralina).

No obstante, se desconocen en TFB detalles más precisos a nivel molecular sobre el fenómeno de represión catabólica, en parte debido a la dificultad que este microorganismo presenta para su manipulación genética en el laboratorio.

4. Degradación de tetralina en *Sphingopyxis macrogolita* estirpe TFA

La bacteria utilizada en el desarrollo de esta tesis es *Sphingopyxis macrogolita* estirpe TFA (Hernaez *et al.*, 1999), una bacteria Gram-negativa, de la clase de las α -proteobacterias y perteneciente a la familia *Sphingomonadaceae*. Dentro de esta familia están incluidos géneros como *Novosphingobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas* o *Sphingopyxis*, ampliamente estudiados en las tres últimas décadas por su capacidad para degradar compuestos recalcitrantes de origen natural o sintético como los PAHs (hidrocarburos policíclicos aromáticos), naftalenos sulfonados, dibenzofuranos, dibenzodioxinas, fenoles y diferentes herbicidas y pesticidas (Stolz, 2009).

Dado que el objetivo de esta Tesis es el estudio del fenómeno de represión catabólica en TFA, se ha empleado la ruta de degradación de tetralina (conocida en esta bacteria) como diana del estudio.

La tetralina (o 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno) es una molécula compuesta por un anillo alicíclico y otro aromático que comparten dos átomos de carbono (Fig. 6). Se produce industrialmente mediante la hidrogenación del naftaleno o el craqueo del antraceno y se emplea como solvente de grasas, resinas y ceras; como sustituyente del aguarrás en las pinturas y lacas y en la industria petroquímica en relación a la licuefacción del carbón. La tetralina también está presente en el alquitrán y en el petróleo.

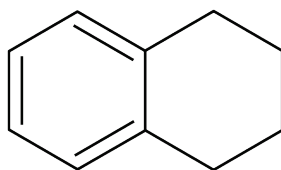


FIG. 6. Molécula de tetralina.

Debido a su carácter lipofílico, esta molécula puede interaccionar con las membranas biológicas, alterando su estructura y funcionalidad. Se ha determinado que la presencia de tetralina induce un incremento del área de la superficie de la membrana, así como la inhibición de bombas primarias de iones y una mayor permeabilidad al paso de protones, disipando el potencial eléctrico y el gradiente de pH (Sikkema *et al.*, 1993,

Sikkema *et al.*, 1992). Además, la tetralina da lugar a la formación de hidroperóxidos altamente mutagénicos en el interior de las células (Ferrante *et al.*, 1995). Todo esto conlleva que la tetralina resulte tóxica para las bacterias en concentraciones mayores a 100 μM en el medio (Sikkema *et al.*, 1992).

4.1. La ruta de degradación de tetralina

A pesar de que se conocen algunas bacterias capaces de emplear la tetralina como única fuente de carbono y energía (Sikkema *et al.*, 1991), el estudio de las rutas de degradación en estas bacterias es casi inexistente. Tan sólo en *Corynebacterium* sp. estirpe C125 (Sikkema *et al.*, 1993) y en *Pseudomonas stutzeri* AS39 (Schreiber *et al.*, 1983) se ha descrito parte de la ruta de degradación. En el primer caso, se sabe que la metabolización de esta molécula se inicia gracias a la actuación de una dioxigenasa sobre el anillo aromático, lo que acaba produciendo su rotura. En el caso de *P. stutzeri*, sin embargo, el proceso se inicia con la hidroxilación del anillo alicíclico.

S. macroglutabida TFA representa, por tanto, el único caso en el que la ruta de degradación de tetralina ha sido estudiada en profundidad mediante el aislamiento de mutantes, secuenciación génica e identificación de compuestos intermediarios producidos durante su metabolismo (Hernaez *et al.*, 1999, Andujar *et al.*, 2000, Hernaez *et al.*, 2000, Hernaez *et al.*, 2002, Andujar *et al.*, 2003, Moreno-Ruiz *et al.*, 2003, Lopez-Sanchez *et al.*, 2010). Además, el tiempo de generación de esta bacteria creciendo a expensas de este compuesto aromático como única fuente de carbono y energía es el menor de los conocidos (12,5 horas), siendo de 18 horas el mejor de los descritos para otras bacterias en la bibliografía (Sikkema *et al.*, 1991).

Los genes implicados en la ruta de degradación de tetralina en *S. macroglutabida*, denominados genes *thn*, están organizados en tres operones distintos (operón B, C y M), expresados desde sus respectivos promotores P_B , P_C y P_M y conteniendo dos de ellos los promotores internos P_R y P_H (Fig. 7).

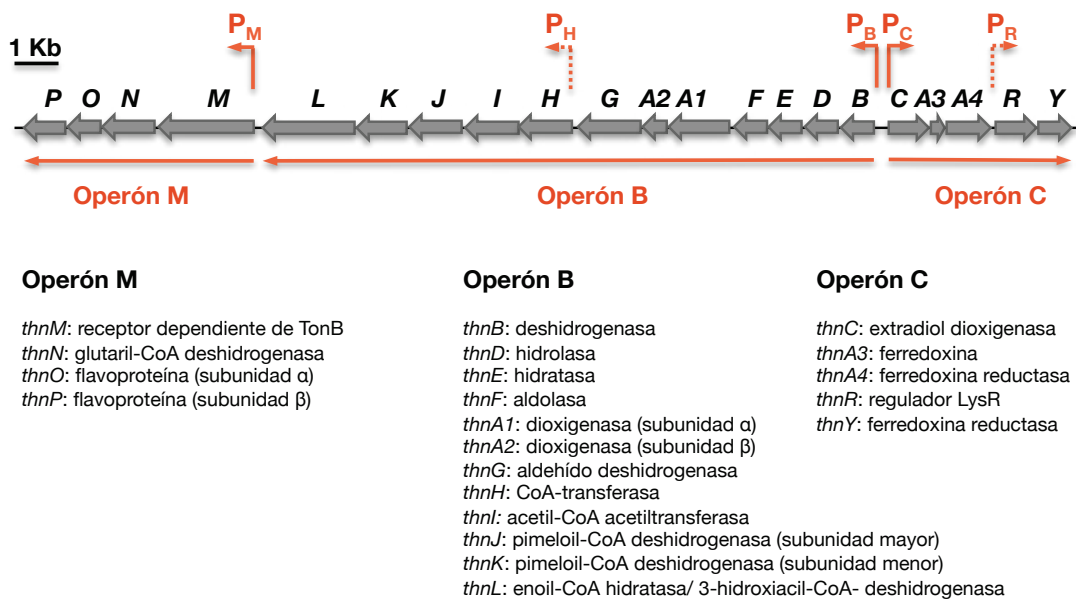


FIG. 7. Organización génica de los operones implicados en la degradación de tetralina en TFA.

Todos los genes contenidos en el operón C y los genes desde *thnB* hasta *thnA2* del operón B resultan imprescindibles para el metabolismo de la tetralina en *S. macroglotabida*. El resto de genes del operón B y del operón M codifican para una aldehído deshidrogenasa (ThnG) y para enzimas de una ruta completa dedicada a la β -oxidación (desde ThnH hasta ThnP). Estos últimos genes son prescindibles debido a que *S. macroglotabida* dispone de otras baterías de genes de β -oxidación que pueden suplir la misma función.

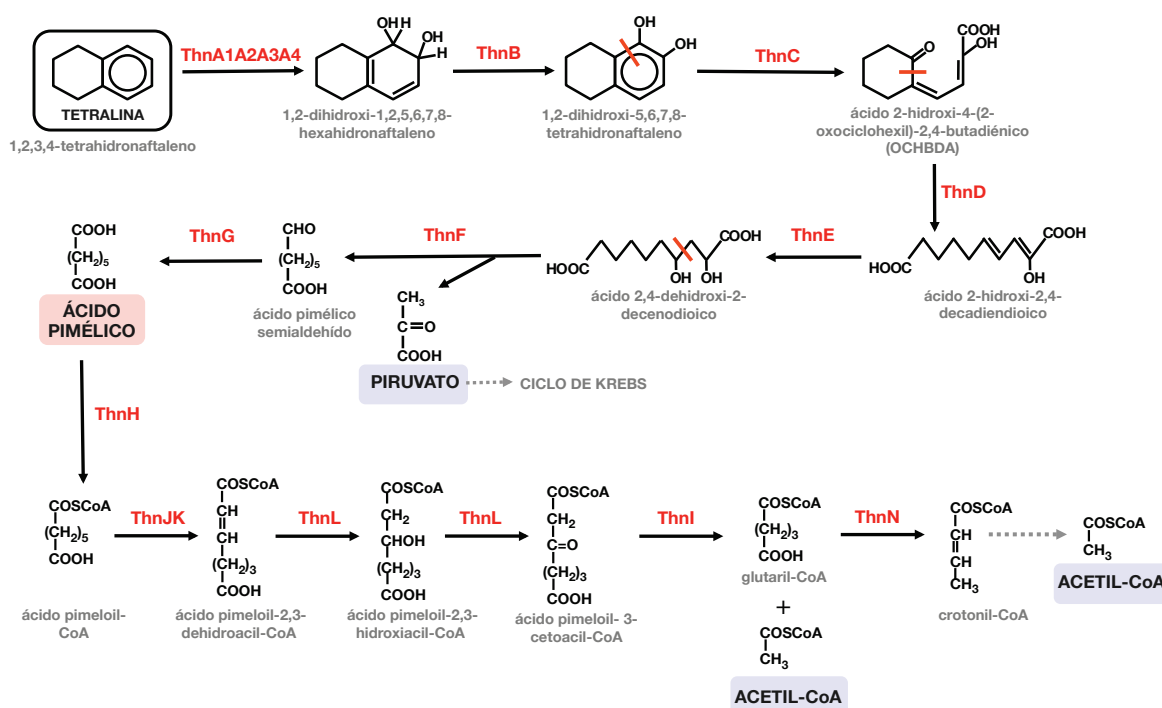


FIG. 8. Ruta de degradación de tetralina en TFA.

La ruta de degradación de tetralina (Fig. 8) se inicia con la dioxigenación del anillo aromático, reacción que requiere oxígeno y el suministro externo de electrones y que está catalizada por el complejo dioxigenasa ThnA1A2A3A4. A continuación, la enzima ThnB genera una doble deshidrogenación y da lugar a 1,2-dihidroxitetralina, sustrato de la dioxigenasa ThnC, que es responsable de la rotura extradiólica del derivado catecólico. Tras la apertura del anillo aromático, se produce la hidrólisis del enlace C-C del anillo alicíclico gracias a la intervención de ThnD, generándose un ácido dicarboxílico de diez átomos de carbono. La acción secuencial de la hidratasa ThnE y la aldolasa ThnF acaba produciendo una molécula de ácido pimélico semialdehído y otra de piruvato. El piruvato es dirigido hacia el metabolismo central a través del ciclo de Krebs, mientras que el ácido pimélico semialdehído es oxidado por ThnG para producir ácido pimélico. Este ácido dicarboxílico de siete carbonos es empleado en la ruta de β oxidación, donde la acción secuencial de ThnH, ThnJ, ThnK, ThnL, ThnI y ThnN genera una molécula de glutaril-CoA, una de acetil-CoA y otra de crotonil-CoA. Esta última, puede seguir metabolizándose hasta acetil-CoA. Por su parte, las enzimas ThnO y ThnP (subunidades α y β de flavoproteína)

sirven como aceptores de electrones de las deshidrogenasas de la ruta de β -oxidación, transfiriéndolos posteriormente a la cadena respiratoria.

4.2. Regulación específica de los genes *thn* de TFA

Mediante ensayos de expresión de fusiones *lacZ* a los genes *thn in vivo* y la construcción de mutantes pudieron identificarse los elementos imprescindibles para la expresión de los genes *thn* (Martinez-Perez *et al.*, 2004), así como el tipo de compuestos en el medio que promueven la inducción (Martinez-Perez *et al.*, 2007) o la represión catabólica de los genes *thn* (Martinez-Perez *et al.*, 2004). Gracias a ensayos de retardo en gel y ensayos de protección frente a DNasa I, pudo caracterizarse el modo de acción del regulador específico de la ruta sobre los promotores *thn* (Lopez-Sanchez *et al.*, 2009). Finalmente, la construcción de nuevos mutantes, los ensayos de expresión *thn in vivo* y varios estudios bioquímicos con proteínas puras han podido desentrañar gran parte del modo de acción y comunicación entre las proteínas reguladoras implicadas en el control de la ruta de degradación de tetralina y algunas enzimas de la misma (Garcia *et al.*, 2011, Ledesma-Garcia *et al.*, 2013).

Los tres elementos imprescindibles para la inducción de la ruta de degradación de tetralina son la molécula de tetralina en sí (que funciona como inductor), el activador transcripcional ThnR y el coactivador ThnY. Además, la ferredoxina ThnA3 implicada en la primera reacción de dioxigenación de la molécula de tetralina, resulta indispensable para el control de la inducción en presencia de moléculas que, a pesar de su parecido con la molécula de tetralina, no son metabolizables mediante la misma ruta. ThnA3 está además implicada en el control del nivel de inducción de los genes *thn* en presencia de tetralina.

Se sabe que la molécula de tetralina, y no otro intermediario de su metabolismo, es la responsable directa de la inducción de todos los operones de la ruta de degradación ya que los mutantes carentes de las enzimas ThnA3 o ThnA4 (que serían incapaces que metabolizar la tetralina) sí mantienen su capacidad de inducción de la ruta. La posibilidad de que otra enzima supla la actividad de ThnA3 o ThnA4 se descarta dado que, al menos en el caso de los mutantes carentes de ThnA3, estos se demuestran incapaces de crecer a expensas de tetralina como única fuente de carbono. Además, la inducción de los genes *thn* también se produce en condiciones de crecimiento en anaerobiosis (usando nitrato como aceptor de electrones) y con tetralina como única fuente de carbono (Francisca

Reyes; datos no publicados), lo que confirma que la transformación de la tetralina (que requiere oxígeno molecular en la primera reacción) no es indispensable para la inducción de los genes *thn*.

El efecto positivo de la tetralina sobre la expresión de la ruta se produce a través de la proteína ThnR, un regulador transcripcional tipo LysR que potencia la expresión de los operones B, C, H y M sólo en presencia del inductor. ThnR se expresa desde dos promotores distintos: desde P_R de manera constitutiva y desde P_C en condiciones de inducción por tetralina. ThnR es por tanto, a diferencia de lo común para los reguladores LysR (Maddocks, 2008), un activador de su propia expresión en presencia del inductor.

En el caso de los cuatro promotores P_C , P_B , P_H y P_M ha podido identificarse y confirmarse la presencia de una secuencia palindrómica que constituye el sitio de unión del activador transcripcional (Fig. 9, adaptada de Lopez-Sanchez *et al.*, 2010). La secuencia reconocida por ThnR es ATCA-N₇-TGAT para los promotores P_B y P_C y sólo distinta en un nucleótido para P_M (ATaA-N₇-TGAT) y P_H (ATtA-N₇-TGAT) (Lopez-Sanchez *et al.*, 2010). En todos los promotores existen, además, secuencias secundarias más aguas abajo de las primarias, y que se han constatado como sitios de unión secundarios de ThnR (Lopez-Sanchez *et al.*, 2009).

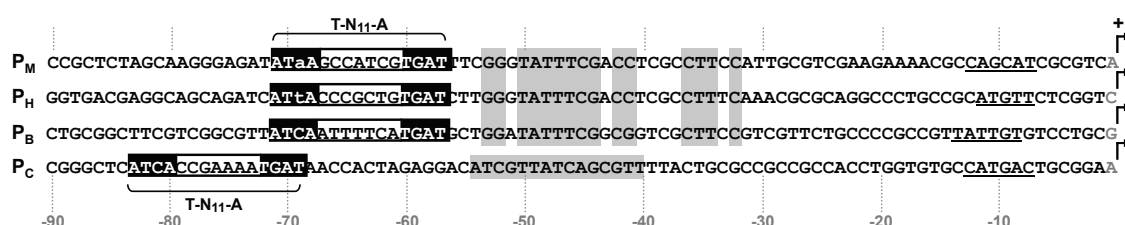


FIG. 9. Secuencias reconocidas por ThnR en los promotores M, H, B y C. Los sitios primarios de reconocimiento están recuadrados. Sombreadas en gris se muestran las regiones de secuencia común de los promotores P_M , P_H y P_B y el sitio secundario de unión de ThnR en P_C . Se indica con una flecha el sitio de inicio de la transcripción.

En el caso de los promotores divergentes P_B y P_C ha podido confirmarse cierta coregulación mediada por ThnR. Aunque los operones B y C pueden expresarse independientemente desde sus respectivos promotores, se ha propuesto que los tetrámeros de ThnR (unidos 2 de sus monómeros a los sitios primarios y otros 2 a los secundarios tanto en P_C como en P_B) interaccionan entre ellos formando un complejo octamérico en la región intergénica B-C que afecta a la expresión de ambos operones y

que implica la formación de un doblez en el ADN. Así, la inserción de media vuelta de hélice entre P_C y P_B (alterando las 5 vueltas completas que existen entre ellos), imposibilita la interacción de los tetrámeros de ThnR situados en caras distintas del ADN (Lopez-Sanchez *et al.*, 2009) y disminuye la expresión tanto desde P_C como desde P_B (Elena Rivas; datos no publicados). Se sabe, además, que la existencia del sitio secundario de unión de P_B (en ausencia de su sitio primario) permite aún un 17% de expresión desde P_B si se mantiene el sitio primario en P_C y que, aunque la afinidad de ThnR por P_C es mayor que por P_B , las mutaciones en el sitio primario de P_B afectan seriamente a la inducción de P_C (Lopez-Sanchez *et al.*, 2009), confirmando la coregulación de ambos.

El otro elemento imprescindible en la activación de la ruta de degradación de tetralina es el coactivador ThnY que, al igual que ThnR, puede transcribirse de manera constitutiva desde el promotor P_R o de manera regulada desde P_C . ThnY es una proteína homóloga a las ferredoxinas reductasas que transfieren electrones desde NAD(P)H hasta las dioxigenasas terminales implicadas en la degradación de compuestos aromáticos. Esta proteína de *S. macrogolita* contiene un grupo [2Fe-2S] de tipo planta y un grupo prostético FAD, pero tiene mutados los residuos conservados del dominio de unión a piridín nucleótidos y se ha demostrado muy ineficiente en la captación de electrones desde dichos donadores. Su papel en relación a la ruta de degradación de tetralina es eminentemente regulador y su función está estrechamente relacionada con ThnR y con la comunicación con el complejo dioxigenasa inicial ThnA1A2A3A4.

Por un lado, los ensayos de retardo en gel con ThnR demuestran que, en presencia de ThnY, se genera un complejo ADN-proteína de orden superior y de mayor afinidad. Puesto que ThnY no posee capacidad de unión al ADN, se deduce que la interacción de ThnR a los promotores P_C y P_B *in vitro* se intensifica en presencia de ThnY y que dicho efecto debe producirse mediante interacción proteína-proteína (Garcia *et al.*, 2011).

En cuanto a su relación con el complejo dioxigenasa inicial, se sabe que la expresión de ThnR y ThnY desde P_{tac} y en presencia de tetralina es suficiente para inducir normalmente la expresión de una fusión *thnC::lacZ* en una estirpe de delección de todos los genes esenciales para la degradación de tetralina. Sin embargo, esta estirpe induce también los genes *thn* en presencia de otros compuestos que se han demostrado malos inductores en la estirpe *S. macrogolita* silvestre (a pesar de su similitud química con la tetralina). Este fenotipo es idéntico al observado en mutantes carentes de la enzima ThnA3. El control de la inducción de la ruta de degradación de tetralina en función de la calidad del

inductor presente en el medio de cultivo debía estar ejercido, por tanto, por algún tipo de comunicación entre el complejo dioxigenasa y el sistema regulador compuesto por ThnR y ThnY, y así fue demostrado. Datos aún no publicados (Ledesma-Garcia, 2012) confirman que puede producirse una transferencia secuencial de electrones desde NAD(P)H hasta el coactivador ThnY a través de ThnA4 y ThnA3. Así, en presencia de un buen inductor (tetralina) la ferredoxina ThnA3 transferiría sus electrones a la dioxigenasa ThnA1A2 para que ésta pudiera catalizar la primera reacción de la ruta. Sin embargo, si el compuesto presente en el medio no es metabolizable por la dioxigenasa, el trasiego de electrones de ThnA3 se recircula hacia ThnY, en lugar de hacia ThnA1A2 (Fig. 10). Aunque aún no se conoce el mecanismo exacto de actuación, se postula que la reducción de ThnY por ThnA3 no permitiría la inducción de la ruta de degradación de tetralina. Este sistema de comunicación evitaría, por tanto, la inducción gratuita de la ruta de degradación de tetralina cuando el compuesto presente en el medio no es metabolizable.

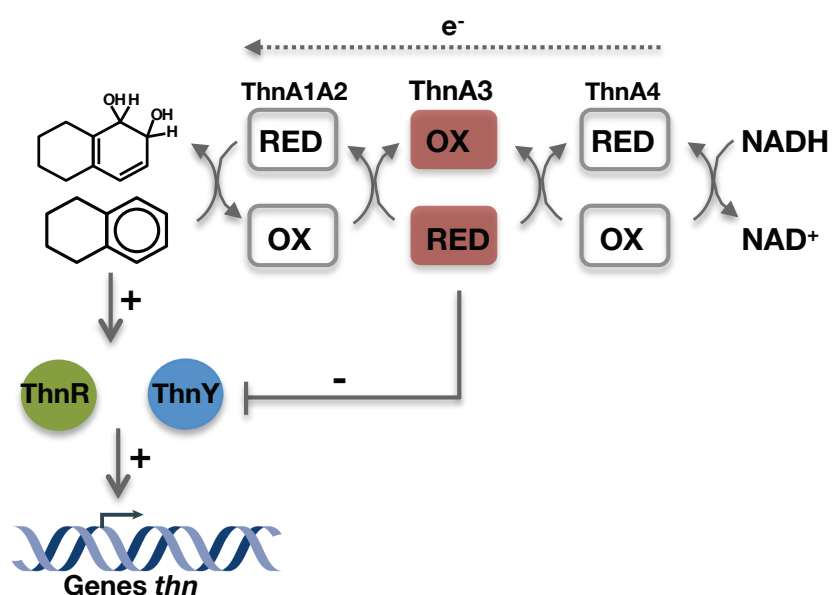


FIG. 10. Modelo propuesto de regulación de la ruta de degradación de tetralina en TFA. En presencia de tetralina, el regulador ThnR y el coactivador ThnY potencian la expresión de los genes de degradación. Sólo en el caso de que la molécula sustrato no sea metabolizable por la dioxigenasa inicial, la transferencia de electrones desde ThnA3 hasta ThnA1A2 se ve interrumpida, acumulándose ThnA3 en su estado reducido y regulando negativamente la actividad de ThnY.

4.3. Regulación global de la ruta de degradación de tetralina

El fenómeno de represión catabólica, que es uno de los sistemas de control global más extendidos entre las bacterias, también está presente en *S. macroglitabida* TFA y afecta directamente a la ruta de degradación de tetralina (Martinez-Perez *et al.*, 2004). Esto implica que la expresión de los genes *thn* no sólo depende de la presencia de tetralina en el medio y de la regulación específica ya descrita sino, también, de la existencia de otras fuentes de carbono en el medio.

S. macroglitabida emplea como fuentes de carbono y energía un intervalo estrecho de compuestos (Hernández Silva, 2000). A diferencia de otras bacterias, es incapaz de metabolizar azúcares como pentosas, hexosas (incluida la glucosa) o disacáridos. Ni tampoco ciertos ácidos mono o dicarboxílicos de cadena corta como piruvato, 2-oxoglutarato o succinato. Sin embargo, sí se observa crecimiento en presencia de algunos mono- y dicarboxilatos de cadena media-larga como el ácido sebácico, ácido mirístico o ácido tetradecanoico. Dado que el crecimiento de *S. macroglitabida* a expensas de β -hidroxibutirato (β -HB; ácido carboxílico de cuatro carbonos) en concentración de 40 mM registra el menor tiempo de generación en medio mínimo (3,5 h), es la fuente de carbono considerada como preferente en esta bacteria.

Se ha demostrado que en un medio rico (LB o MML) o en un medio mínimo conteniendo β -HB 40 mM, la disponibilidad de tetralina no es suficiente para inducir la expresión de su ruta de degradación. En la figura 11 (tomada de Martinez-Perez *et al.*, 2004) puede apreciarse como la expresión del gen *thnC* es prácticamente inexistente hasta transcurridas muchas horas (al menos 10 h en MML o 15 h en β -HB 40 mM). El nivel y el tiempo de mantenimiento de la represión sobre el gen *thnC* es, además, directamente proporcional a la concentración de β -HB empleada, confirmándose que la disponibilidad de hidroxibutirato impide la expresión de la ruta de degradación de tetralina. Esta represión en presencia de β -HB 40 mM también se ejerce sobre los promotores P_B (Martinez-Perez, 2008), P_H y P_M (Lopez-Sanchez *et al.*, 2010).

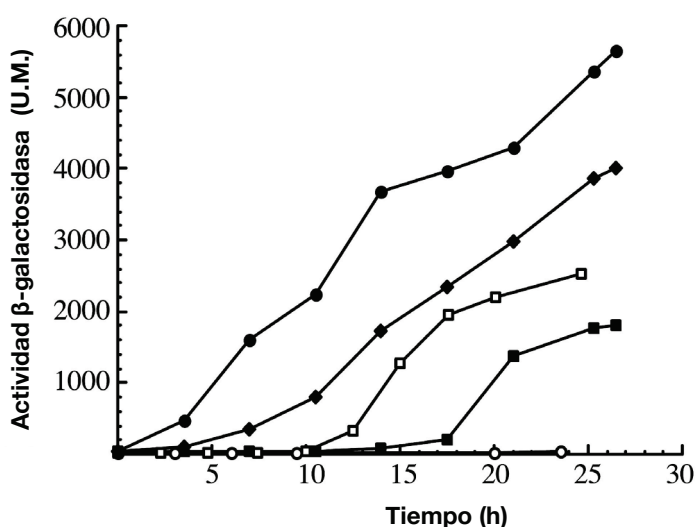


FIG. 11. Expresión de la fusión *thnC::lacZ* en TFA en distintas condiciones de represión catabólica. Ensayos realizados en medio mínimo suplementado con tetralina y 8mM (●), 20mM (◆) o 40mM (■) de β-hidroxibutirato, MML (□) o LB (○).

El fenómeno de represión catabólica no sólo es evidente en presencia de ese ácido carboxílico, sino también al simultanear tetralina y otros ácidos grasos (hexanoico, octanoico, sebácico o subérico) en concentración de 10 mM, indicando que otras fuentes de carbono ejercen el mismo efecto (Martínez-Pérez, 2008).

Se ha descartado además, para *S. macroglotabida*, que la expresión *thn* esté causada por un crecimiento lento, y que, por tanto, la menor inducción registrada en presencia de otras fuentes de carbono sea consecuencia de una mayor velocidad de crecimiento. El uso en TFA de fuentes de nitrógeno que reducen la tasa de crecimiento en los cultivos con tetralina demostró que la expresión de la ruta de degradación no se induce en esas condiciones y que, por tanto, podía descartarse una relación entre la velocidad lenta de crecimiento y la expresión de los genes *thn*. En su lugar, se constata que es la falta de otra fuente de carbono y la presencia de tetralina en el medio lo que la potencia.

El estudio de la base molecular que subyace al proceso de represión catabólica en *S. macroglotabida* TFA se ha convertido en un área de especial interés debido a un par de razones fundamentales. En primer lugar, porque constituye una de las últimas piezas esenciales que afectan a la degradación de tetralina y que quedan por comprender. Y en segundo lugar, porque el mecanismo de represión catabólica está escasamente

documentado en general (siendo las únicas referencias importantes las descritas al inicio de esta introducción), pero aún menos en α -proteobacterias (con la única excepción de *S. meliloti*) y nada documentado dentro del orden *Sphingomonadales*, a pesar de comprender este grupo varios géneros de bacterias con relevante potencial en biorremediación.

Dada la falta de información en α -proteobacterias, las primeras investigaciones sobre represión catabólica en *S. macrogolitabida* TFA carecían de referentes importantes en otras bacterias similares. En consecuencia, las primeras estrategias aplicadas pretendían focalizar el área de estudio. Por un lado, y motivado por los estudios publicados sobre la ubiquinol oxidasa terminal Cyd de *P. putida* (ver apartado 2.3 de esta Introducción), se analizó la posible relación entre el fenómeno de represión catabólica y la cadena de transporte de electrones o la producción de ATP en las células (Moreno Ruiz, 2004). En segundo lugar, se practicó una mutagénesis exhaustiva por transposición en *S. macrogolitabida* TFA con el objetivo de identificar genes implicados en represión catabólica (Moreno Ruiz, 2004, Martín-Cabello *et al.*, 2011). En otra mutagénesis generalizada desarrollada previamente en TFA y encaminada a la búsqueda de elementos imprescindibles para la expresión de los genes *thn* no se consiguió identificar ningún otro gen (distinto a *thnR* y *thnY*) indispensable para esa función, poniendo de manifiesto que era improbable la existencia de alguna proteína que ejerciera, junto con ThnR y ThnY, un control positivo sobre la inducción de los genes *thn* durante el crecimiento en tetralina. Resultaba más plausible pensar, por tanto, que la represión catabólica estaba provocada por la actuación de alguna proteína que impedía activamente (por control negativo) la expresión de los genes *thn* en presencia de una fuente de carbono preferencial en el medio que por la ausencia de actividad de una tercera proteína activadora en las mismas condiciones. Los mutantes carentes de función debido a la inserción tendrían por tanto un fenotipo de falta de represión catabólica.

En relación a la primera estrategia, se analizó el nivel de expresión de los genes de degradación de tetralina observado en cultivos de *S. macrogolitabida* TFA crecidos en condiciones de represión catabólica y en presencia de concentraciones subletales de compuestos que alteraban el flujo de electrones o el gradiente de protones necesarios para la producción de ATP. En todos los casos, se descartó que existiera una implicación de la cadena de transporte de electrones en el fenómeno de represión catabólica (Moreno Ruiz, 2004).

En cuanto a la mutagénesis exhaustiva, se llevó a cabo una búsqueda de candidatos desreprimidos catabólicamente por carencia de función tras la inserción al azar de casetes miniTn5Km en una estirpe de *S. macroglutabida* TFA que portaba una fusión traduccional *thnC::lacZ* en el cromosoma. A pesar del alto número de colonias escrutadas (alrededor de 10^6) tan solo 8 resultaron finalmente de interés por presentar un patrón inusual de inducción *thn* a lo largo del tiempo en condiciones de represión catabólica, siendo capaces de inducir los genes de degradación de tetralina a las pocas horas de ser inoculados en medio rico MML con tetralina. El mismo fenotipo de inducción *thn* temprana se obtuvo para cultivos de estos mutantes creciendo en medio mínimo suplementado con tetralina y β -HB 40 mM. Como puede observarse en la figura 12 (tomada de Martin-Cabello *et al.*, 2011), la inducción comienza a partir de las 4 horas en todos los candidatos y alcanza niveles máximos de 2000 U.M. Ninguno de los mutantes presentó, sin embargo, alteración alguna en el patrón de expresión de los genes de tetralina cuando eran cultivados con este compuesto como única fuente de carbono, alcanzando todos ellos los niveles máximos habituales de inducción de entre 4500 y 6000 U.M. para esa condición (Martinez-Perez *et al.*, 2004). Los ensayos de expresión, en conjunto, pusieron de manifiesto que los 8 mutantes estaban desreprimidos catabólicamente, pero sólo parcialmente.

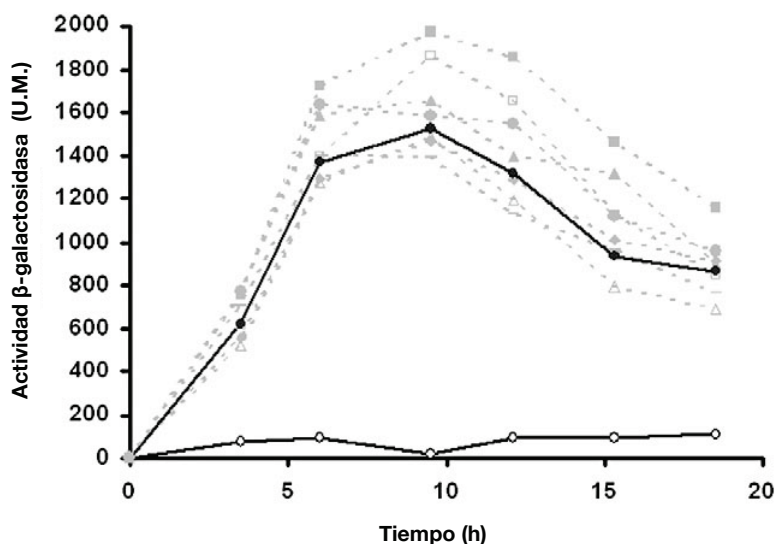


FIG. 12. Expresión de la fusión *thnC::lacZ* en TFA (o) y en los mutantes afectados en *phaC* en condiciones de represión catabólica. Se resalta uno de los mutantes -MPO209- (●). Ensayos realizados en medio mínimo suplementado con tetralina y 40mM de β -hidroxibutirato.

Tras la secuenciación de las inserciones, pudo saberse que, en todos los casos, estas se habían producido en el gen que codifica para una polihidroxialcanoato sintetasa (*phaC*) o, en uno de los casos, en el gen justo aguas arriba, causando, probablemente, un efecto polar.

Con el objetivo de caracterizar en mayor profundidad a uno de los mutantes, denominado MPO209, se realizó una cuantificación de la acumulación de polímero de hidroxibutirato en condiciones de represión catabólica. El resultado obtenido (Fig. 13, tomada de Martin-Cabello *et al.*, 2011) demostró que el mutante MPO209 estaba afectado negativamente en la producción de gránulo de polihidroxibutirato (PHB) en comparación con la estirpe silvestre.

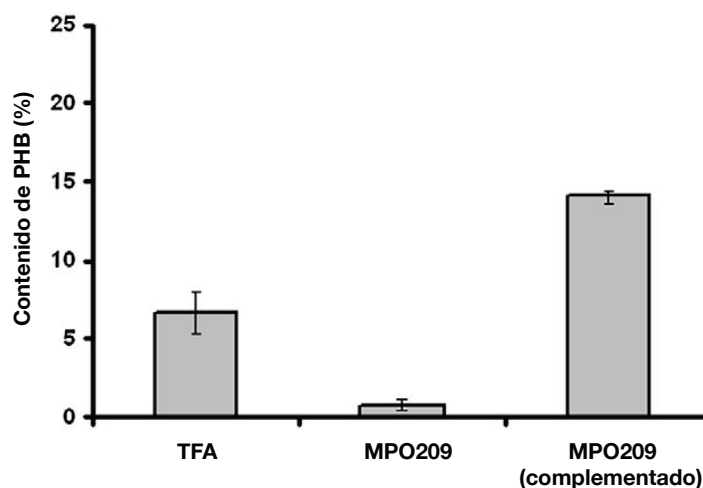


FIG. 13. Acumulación de PHB en TFA, en el mutante MPO209 afectado en *phaC* y en el mismo mutante complementado. Medido mediante GC-MS y expresado como porcentaje del peso seco del total de biomasa de las células a las 12 horas del crecimiento en medio mínimo con tetralina y 40 mM de β -hidroxibutirato.

La complementación del mutante MPO209 con la versión silvestre del gen *phaC* recuperó ambos fenotipos silvestres de expresión *thn* y de acumulación de PHB.

Ya que los gránulos de reserva suponen un sumidero del exceso de carbono y poder reductor en las bacterias (Madison *et al.*, 1999), se concluyó que la acumulación de PHB podría constituir en *S. macroglotabida* TFA una señal de alta disponibilidad de carbono, repercutiendo, por tanto, en el fenómeno de represión catabólica. Sería posible que bien la acumulación de gránulo en sí o bien su ruta biosintética formaran parte de la

señal represora. En el último caso, la alteración de la ruta de síntesis podría desencadenar alteraciones importantes en la fisiología de la bacteria, provocando que las células interpretaran estar en situación de limitación de carbono aún cuando en el medio hay abundancia de la fuente de carbono preferencial.

Finalmente, la desrepresión observada en los mutantes fue solo parcial, por lo que se concluyó que otros mecanismos adicionales tendrían que estar participando en el fenómeno de represión catabólica en *S. macrogolítabida* TFA.

OBJETIVOS

El propósito de esta Tesis es el estudio del fenómeno de represión catabólica en *Sphingopyxis macrogolita* TFA. Este tipo de regulación global está bien caracterizado en las principales bacterias modelo, pero su base molecular es totalmente desconocida dentro del orden *Sphingomonadales*, a pesar de que este grupo alberga varios géneros de bacterias con un potencial relevante en biorremediación. Dado que en TFA se ha caracterizado completamente el metabolismo de la tetralina, se ha empleado esta ruta de degradación como referencia para el estudio de la base molecular que dirige el proceso de represión catabólica. Para ello, se han desarrollado los siguientes objetivos de investigación específicos:

1. Estudio de la fisiología del proceso de represión catabólica en TFA mediante el análisis del crecimiento y de los cambios en el proteoma.
2. Determinación de la implicación del regulador transcripcional CdnL en la base molecular de la represión catabólica.
3. Determinación de la implicación de la proteína transductora de señales con dominios CBS en la base molecular de la represión catabólica.
4. Determinación de la implicación del sistema de dos componentes FixL-FixJ en la base molecular de la represión catabólica.
5. Estudio de la relación del sistema fosfotransferasa con el fenómeno de represión catabólica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estirpes, plásmidos y condiciones de cultivo

1.1. Estirpes y plásmidos

A continuación se detallan las estirpes bacterianas y plásmidos utilizados en el desarrollo de este trabajo.

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas durante la realización de esta Tesis

Estirpe	Características relevantes	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ lacZYA-argF U169 recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁻) supE44 thi-1 gyrA relA1	Hanahan, 1983
<i>Sphingopyxis macrogolita</i> TFA		
TFA	Estirpe silvestre. Str ^r .	Hernaez <i>et al.</i> , 1999
TFA-1002	Fusión traduccional <i>thnC::lacZ</i> . Str ^r Ap ^r .	Martinez-Perez <i>et al.</i> , 2004
TFA-1003	Fusión traduccional <i>thnB::lacZ</i> . Str ^r Ap ^r .	Martinez-Perez <i>et al.</i> , 2004
MPO209	Inserción miniTn5Km en PHA sintetasa	Martin-Cabello <i>et al.</i> , 2011
MPO209-1002	Derivado de MPO209 con integración de la fusión traduccional <i>thnC::lacZ</i> en la zona intergénica <i>thnB-thnC</i> .	Martin-Cabello <i>et al.</i> , 2011
MPO801	Inserción de un gen de resistencia a ampicilina tras el codón 152 del gen <i>fixJ1</i> . Str ^r Ap ^r .	Esta tesis
MPO803	Sustitución del gen <i>bhpQ2</i> desde el primer codón hasta 265 pb aguas abajo por un gen de resistencia a kanamicina. Str ^r Km ^r .	Esta tesis
MPO804	Doble mutante con la inserción de MPO801 y la sustitución de MPO803. Str ^r Ap ^r Km ^r .	Esta tesis
MPO808	Sustitución de los genes <i>fixL2J2</i> desde el cuarto codón de <i>fixL2</i> hasta 265 pb aguas abajo de <i>fixJ2</i> por un gen	Esta tesis

Estirpe	Características relevantes	Referencia
	de resistencia a kanamicina. El mutante resultante carece de los genes <i>fixL2J2</i> . Str ^r Km ^r .	
MPO809	Deleción interna en fase del codón 7 al 270 del gen <i>hprK_relA</i> quedando una proteína truncada de 25 aminoácidos. Str ^r .	Esta tesis
MPO811	Sustitución de toda la región codificante de los genes <i>fixL1J1</i> por un gen de resistencia a ampicilina. Str ^r Ap ^r .	Esta tesis
MPO812	Doble mutante con las sustituciones de los mutantes MPO808 y MPO811, resultando en una estirpe carente de los genes <i>fixL1J1</i> y <i>fixL2J2</i> . Str ^r Ap ^r Km ^r .	Esta tesis
MPO815	Sustitución del gen <i>hpr</i> desde el codón 8 hasta el 92 por un gen de resistencia a kanamicina. Str ^r Km ^r .	Esta tesis
MPO816	Sustitución del gen <i>cbs</i> desde el codón 1 al 122 por un gen de resistencia a kanamicina. Str ^r Km ^r .	Esta tesis
MPO817	Derivado de MPO809 con integración de la fusión traduccional <i>thnC::lacZ</i> en la zona intergénica <i>thnB-thnC</i> . Str ^r Ap ^r .	Esta tesis
MPO818	Derivado de MPO809 con integración de la fusión traduccional <i>thnB::lacZ</i> en la zona intergénica <i>thnB-thnC</i> . Str ^r Ap ^r .	Esta tesis
MPO819	Derivado de MPO815 con integración de la fusión traduccional <i>thnC::lacZ</i> en la zona intergénica <i>thnB-thnC</i> . Str ^r Km ^r Ap ^r .	Esta tesis
MPO820	Derivado de MPO815 con integración de la fusión traduccional <i>thnB::lacZ</i> en la zona intergénica <i>thnB-thnC</i> . Str ^r Km ^r Ap ^r .	Esta tesis
MPO821	Derivado de MPO816 con integración de la fusión traduccional <i>thnC::lacZ</i> en la zona intergénica <i>thnB-thnC</i> . Str ^r Km ^r Ap ^r .	Esta tesis
MPO822	Derivado de MPO816 con integración de la fusión traduccional <i>thnB::lacZ</i> en la zona intergénica <i>thnB-thnC</i> . Str ^r Km ^r Ap ^r .	Esta tesis
MPO824	Derivado de la estirpe MPO809. Deleción del codón 6	Esta tesis

Estirpe	Características relevantes	Referencia
	al 134 del gen <i>hprK</i> e inserción en la intergénica aguas arriba de un gen de resistencia a kanamicina y otro a gentamicina. Se respetan hasta 267 pb aguas arriba del GTG de inicio de <i>hprK</i> . Str ^r Km ^r Gm ^r .	
MPO825	Derivado de MPO824 con integración de la fusión traduccional <i>thnC::lacZ</i> en la zona intergénica <i>thnB-thnC</i> . Str ^r Km ^r Gm ^r Ap ^r .	Esta tesis

Tabla 2. Plásmidos utilizados durante la realización de esta Tesis

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pBluescript II SK (+)	Vector de clonación. Ap ^r .	Stratagene
pLAFR3Tc	IncP Tc ^r Tra ⁻ Mob ⁺ ; cósmido.	Staskawicz <i>et al.</i> , 1987
pIZ1002	Fusión traduccional <i>thnC::lacZ</i> en pJES379. Contiene la región intergénica <i>thnB-thnC</i> . Ap ^r .	Martinez-Perez <i>et al.</i> , 2004
pIZ1003	Fusión traduccional <i>thnB::lacZ</i> en pJES379. Contiene la región intergénica <i>thnB-thnC</i> . Ap ^r .	Martinez-Perez <i>et al.</i> , 2004
pRK2013	Plásmido auxiliar en conjugaciones. Replicón ColE1. Tra ⁺ , Km ^r .	Figurski <i>et al.</i> , 1979
pEX18Tc	Vector empleado para facilitar dobles eventos de recombinación en el cromosoma bacteriano gracias a la selección de resistencia a sacarosa. Mob ⁺ <i>sacB</i> ⁺ Tc ^r .	Hoang <i>et al.</i> , 1998
pMPO234	Vector de amplio espectro para fusiones transcripcionales <i>trp-lacZ</i> , basado en pBBR1MCS-4. Mob ⁺ Ap ^r .	Garcia-Gonzalez <i>et al.</i> , 2005
pMPO284	Derivado de pPS854 que contiene el gen de resistencia a kanamicina del vector pUTminiTn5Km flanqueado por 2 secuencias FRT. Ap ^r Km ^r .	Jiménez-Fernández, 2014
pMPO364	Derivado de pUC18 que contiene el atenuador de la	Colección del

Plásmido	Características relevantes	Referencia
	transcripción <i>nasF</i> , el activador transcripcional <i>nahR</i> bajo su promotor <i>Pnah</i> y un promotor <i>Psal</i> en dirección contraria seguido de otro atenuador de la transcripción <i>nasF</i> . Ap ^r .	laboratorio (S. Muñoz)
pMPO494	Derivado de pUC18 en el que se ha clonado un gen <i>bla</i> interrumpiendo el gen de resistencia a tetraciclina. Ap ^r .	Colección del laboratorio (C. Amador)
pUC18Sfi-miniTn7-BB-Gm	Derivado de pUC18Sfi portando el transposón sintético miniTn7-BBGm. Ap ^r , Gm ^r , Mob ⁻	Colección del laboratorio (F. Govantes)
pMPO1125	pEX18Tc conteniendo 803 pb de la región aguas arriba y 700 pb de la región aguas abajo del gen <i>cdnL</i> , flanqueando un gen de resistencia a kanamicina. Tc ^r Km ^r	Esta tesis
pMPO1126	pEX18Tc conteniendo 700 pb de la región aguas arriba y 800 pb de la región aguas abajo del gen <i>cbs</i> , flanqueando un gen de resistencia a kanamicina. Tc ^r Km ^r .	Esta tesis
pMPO1127	pBluescript II SK+ con un fragmento con las primeras 465 pb codificantes del gen <i>fixJ1</i> conteniendo 3 codones de stop y 1 desfase en las 12 primeras pb y otros 3 codones de stop a partir del codón 147. Se añadió un oriT. oriT ⁺ Ap ^r .	Esta tesis
pMPO1128	pEX18Tc conteniendo 600 pb de la región aguas arriba y 500 pb de la región aguas abajo del gen <i>fixJ2</i> , flanqueando un gen de resistencia a kanamicina. Tc ^r Km ^r .	Esta tesis
pMPO1129	pLAFR3Tc con los siguientes elementos clonados en orden: atenuador de la transcripción <i>nasF</i> , gen codificante del activador transcripcional NahR bajo su propio promotor <i>Pnah</i> , promotor <i>Psal</i> , atenuador de la transcripción <i>nasF</i> y gen <i>lacZ</i> con su propia secuencia Shine-Dalgarno (SD). Tc ^r .	Esta tesis

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pMPO1130	pBluescript II SK (+) con fragmento conteniendo 165 pb de la zona codificante del gen <i>cdnL</i> y 199 pb de su secuencia original aguas arriba. Se conserva la SD de <i>cdnL</i> , pero no las cajas -35 y -10 del promotor. En su lugar, se ha clonado un promotor <i>Psal</i> . Entre <i>Psal</i> y <i>cdnL</i> hay un atenuador de la transcripción <i>nasF</i> . En dirección contraria se han clonado el gen del activador transcripcional NahR (bajo su propio promotor) y un segundo atenuador de la transcripción <i>nasF</i> . Se añadió un oriT. Ap ^r , oriT ⁺ .	Esta tesis
pMPO1131	pEX18Tc conteniendo 714 pb de la región aguas arriba y 500 pb de la región aguas abajo de los genes <i>fixL2J2</i> , flanqueando un gen de resistencia a kanamicina. Tc ^r Km ^r .	Esta tesis
pMPO1132	pEX18Tc en el que se han clonado 804 pb de la región aguas arriba de <i>hprK_relA</i> (hasta el codón 6 de dicho gen) y 704 pb de la región aguas abajo (desde el codón 271 de <i>hprK_relA</i>) flanqueando un gen de resistencia a kanamicina. Tc ^r Km ^r	Esta tesis
pMPO1140	pLAFR3Tc con los siguientes elementos clonados en orden: atenuador de la transcripción <i>nasF</i> , gen codificante del activador transcripcional NahR bajo su propio promotor <i>Pnah</i> , promotor <i>Psal</i> , atenuador de la transcripción <i>nasF</i> y gen <i>lacZ</i> con su propia SD. Tc ^r .	Esta tesis
pMPO1141	Es la misma construcción que pMPO1130 eliminando el atenuador de la transcripción <i>nasF</i> localizado entre <i>Psal</i> y el fragmento de <i>cdnL</i> . Ap ^r	Esta tesis
pMPO1142	pEX18Tc conteniendo 700 pb de la región aguas arriba y 800 pb de la región aguas abajo de los genes <i>fixL1J1</i> , flanqueando un gen de resistencia a ampicilina. Tc ^r Ap ^r .	Esta tesis
pMPO1146	pEX18Tc conteniendo 800 pb de la región aguas	Esta tesis

Plásmido	Características relevantes	Referencia
	arriba y 700 pb de la región aguas abajo del gen <i>hpr</i> , flanqueando un gen de resistencia a kanamicina. Tc ^r Km ^r .	
pMPO1148	pEX18Tc conteniendo 1280 pb de la región aguas arriba y 1494 pb de la región aguas abajo del gen <i>hprK</i> , flanqueando un gen de resistencia a kanamicina y otro a gentamicina. Gm ^r , Tc ^r Km ^r .	Esta tesis

1.2. Medios y condiciones de cultivo

Escherichia coli

Para cultivar las distintas estirpes de *E. coli*, tanto en medio líquido como en placa, se utilizó medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook, 1989) con distintas adiciones. En general, los cultivos se incubaron a 37 °C y 180 rpm de agitación, salvo que se indique expresamente lo contrario.

LB: Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l. En el caso de LB sólido se añade agar 15 g/l. Autoclavar.

Sphingopyxis macrogolita TFA

Como medio rico se empleó MML (Andujar *et al.*, 2000). Como medio mínimo se usó MM (Dorn *et al.*, 1974) suplementado con distintas fuentes de carbono, como β -hidroxibutirato (β -HB), ácido sebácico o tetralina. Los cultivos de *S. macrogolita* se incubaron siempre a 30 °C y 180 rpm de agitación.

MML: Tripton 2 g/l, extracto de levadura 1 g/l. En el caso de LB sólido: agar 15 g/l. Autoclavar. Añadir Solución 1 al 2% (v/v) y solución 2+3 al 2% (v/v).

MM: H₂O bidestilada (y agar 20 g/l en el caso de medio sólido). Autoclavar. Añadir Solución 1 al 2% (v/v), solución 2+3 al 2% (v/v) y fuente de carbono.

Solución 1: Na₂HPO₄·12H₂O 3% (p/v), K₂HPO₄ 5 % (p/v). Autoclavar.

Solución 2: Ca(NO₃)₂·4H₂O 0,25% (p/v), (NH₄)₂SO₄ 5 % (p/v), MgSO₄·7H₂O 1% (p/v), hierro amonio (III) citrato 0,05% (p/v). Autoclavar.

Solución 3: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1% (p/v), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,03% (p/v), H_3BO_3 0,3% (p/v), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2% (p/v), $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 % (p/v), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 % (p/v). Filtrar.

Solución 2+3: Mezclar 190 ml de solución 2 con 10 ml de solución 2+3.

Debido a la baja solubilidad en agua de la tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno), este compuesto se suministró en forma de vapor tanto en los cultivos líquidos como en los sólidos. En el caso del medio líquido se usaron o bien botes de 50 ml de volumen total o matraces, según el volumen de cultivo requerido. Tanto los botes como los matraces utilizados (Fig. 14A-B) se saturaron durante 3-4 días a 30 °C con 50 μl (botes) o 2 ml (matraces) de tetralina antes de ser inoculados. Los cultivos sólidos con vapores de tetralina se incubaron en cajas de cultivo introducidas en botes herméticos (Fig. 14C)



FIG. 14 Sistemas de cultivo de *S. macrogolabida* TFA en presencia de tetralina. A. Bote utilizado para cultivo en medio líquido con tetralina suministrada en fase gaseosa. La tetralina (50 μl) se añadió en un tubo Eppendorf con perforaciones alrededor de la línea de 0,5 ml, que permitía la salida de los vapores de tetralina. B. Matraz utilizado para cultivo de gran volumen en medio líquido con tetralina suministrada en fase gaseosa. La tetralina (2 ml) está contenida en un tubo de 10 ml abierto completamente por la parte superior. C. Bote de cristal utilizado para el cultivo de *S. macrogolabida* en medio sólido con tetralina en fase gas. La tetralina se añadió en tapones de tubos Eppendorf, que se situaron sobre las placas, como marca la flecha. Se utilizaron siempre dos tapones, con 50 μl de tetralina en cada uno de ellos.

Las concentraciones de antibióticos y otros aditivos que se añadieron a los distintos medios de cultivo se detallan a continuación (tabla 3).

Compuesto	Concentración en el medio	
	<i>E. coli</i>	<i>S. macrogolita</i>
Ampicilina	100 mg/l	5 mg/l
Estreptomicina	-	50 mg/l
Kanamicina	25 mg/l	10 mg/l
Tetraciclina	10 mg/l	5 mg/l
X-gal	25 mg/l	25 mg/l
Sacarosa	-	10% (p/v)
Salicilato	-	2 mM

Tabla 3. Concentraciones de antibióticos y otros agentes químicos añadidos a los medios de cultivo.

1.3. Conservación de estirpes bacterianas

Para la conservación a largo plazo, las distintas estirpes se congelaron en medio rico líquido con glicerol al 15 % (v/v) y se almacenaron a -80 °C.

2. Transferencia de ADN a estirpes bacterianas

2.1. Transformación de células de *Escherichia coli* mediante choque térmico.

2.1.1. Preparación de células competentes

Para transformar células de *E. coli* DH5 α con plásmidos o ligaciones, se prepararon células competentes según una variante del método de Inoue y colaboradores (Inoue *et al.*, 1990), con el que se consigue una alta frecuencia de transformación (de 5×10^7 a 10^9 transformantes por μ g de ADN plasmídico). Para ello, un cultivo saturado de DH5 α se diluyó 100 veces en 200 ml de medio SOB y se incubó en agitación a 22 °C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,5. El cultivo se transfirió entonces rápidamente a hielo, donde se mantuvo durante 10 minutos. A continuación, se recogieron las células mediante centrifugación a 2.500 g durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento de células se resuspendió en 20 ml de TB frío, a los que se añadieron otros 60 ml de TB también frío. Dicha resuspensión de células se incubó 10 minutos en hielo. Tras ese tiempo, se recogieron de nuevo las células en las

mismas condiciones y se resuspendieron en 20 ml de TB frío. Finalmente, se añadieron 1,5 ml de DMSO, se incubaron 10 minutos en hielo y se hicieron alícuotas de 0,3 y 0,5 ml, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Medio SOB: triptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 8,5 mM, KCl 1,25 mM. Ajustar el pH a 7,0 con NaOH y autoclavar. Añadir posteriormente MgCl_2 10 mM y glucosa 0,36 mM.

TB: Pipes (ácido libre) 10 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15 mM, KCl 250 mM. Ajustar el pH a 6,7 con KOH. Añadir $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 55 mM. Esterilizar por filtración.

2.1.2. Transformación

Para transformar las células competentes se añadieron 50 ng de una preparación de plásmido o, en su caso, 10 μl de las reacciones de ligación. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos y, a continuación, se sometió a choque térmico a 42 °C durante 45 segundos. Pasado ese tiempo, las células se colocaron rápidamente en hielo y se les añadió 1 ml de LB a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron a 37 °C durante 60 minutos, se sembraron en cajas de medio selectivo y se incubaron toda la noche a dicha temperatura.

2.2. Electrotransformación de *Sphingopyxis macrogolitabida*

2.2.1. Preparación de células electrocompetentes

Para la preparación de células electrocompetentes de *S. macrogolitabida* se usó, en primer lugar, un cultivo de la estirpe receptora en 10 ml de MML y se incubó a 30 °C durante aproximadamente 24 horas, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 1,5 y 2 (saturación). Se diluyó entonces a D.O.₆₀₀ de 0,1 en 100 ml de MML fresco y se incubó con agitación a 30 °C hasta una D.O.₆₀₀ aproximada de 0,4. El cultivo se enfrió rápidamente en hielo durante 10 minutos y se recogieron las células mediante centrifugación a 3830 *g* durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, se lavaron las células de forma sucesiva en 100 ml y 50 ml de agua bidestilada en frío y 2 ml de glicerol al 10 % en agua bidestilada (v/v) en frío. Finalmente, las células se resuspendieron en 250 μl de glicerol al 10 % (v/v) en frío, se repartieron en alícuotas de 40 μl y se almacenaron a -80 °C.

2.2.2. Electroporación

Cada alícuota de células electrocompetentes se mezcló con unos 50 ng de ADN plásmidico libre de sales, manteniendo la mezcla en hielo. Las suspensiones se transfirieron a cuéps de electroporación con una distancia entre electrodos de 2 mm y se sometieron a una diferencia de potencial de 2,5 kV en un electroporador Micropulser TM (Bio-Rad). Inmediatamente después del pulso, las células se diluyeron en 1 ml de medio MML con sorbitol 0,5 M, se mantuvieron durante 60 minutos a 30 °C, se sembraron en medio selectivo y se incubaron 5 o 6 días a la misma temperatura.

2.3. Conjugación triparental

Para transferir plásmidos movilizables desde *E. coli* (estirpe donadora) a *S. macrogolitabida* (estirpe receptora), se utilizó como cepa auxiliar *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pRK2013, en el que se incluyen los genes de transferencia (Tabla 2). Para la conjugación triparental, se cultivaron las cepas de *E.coli* (en LB) y *S. macrogolitabida* (en MML) hasta una D.O.₆₀₀ aproximada de 0,4 y se mezclaron los cultivos en proporción 1:1:5 (donador:auxiliar:receptor) en un volumen final de 1 ml. La mezcla se centrifugó 10 minutos y el sedimento de células se resuspendió en 50 μ l de tampón fosfato. La gota conteniendo el sedimento de células se depositó sobre una caja de MML, se dejó secar en una campana de flujo laminar y se incubó durante toda la noche a 30 °C. Tras la incubación, se recogió la biomasa con un asa de siembra y se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato. Finalmente, las células se sembraron en medio selectivo con diluciones de 10¹ a 10⁵ veces.

Tampón fosfato: Na₂HPO₄·12H₂O 17 mM, KH₂PO₄ 7,35 mM. Autoclavar.

3. Manipulación de ácidos nucleicos

3.1. Manipulación de ADN

3.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *Escherichia coli* a pequeña escala

Para extraer ADN plasmídico de *E. coli* DH5 α se siguió el protocolo simplificado de lisis alcalina (Stephen *et al.*, 1990). La biomasa de 3 ml de un cultivo saturado se recogió por centrifugación a 16.100 *g* durante 60 segundos. El sedimento se resuspendió en 100 μ l de GTE y se incubó 5 minutos en hielo. A la solución anterior se añadieron 200 μ l de solución II preparada fresca. Los tubos conteniendo el total de esa solución se incubaron de nuevo 5 minutos en hielo y se agitaron por inversión repetidas veces. A continuación, se añadieron 150 μ l de solución III, seguido del mismo proceso de homogenización e incubación en hielo. Tras ese paso, se sedimentaron los restos celulares por centrifugación 5 minutos a 16.100 *g*. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, se añadió 1 volumen (450 μ l) de etanol al 96 % (v/v) a -20°C y se centrifugó inmediatamente 5 minutos a 16.100 *g*. Finalmente, el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70 % (v/v) a -20°C , se secó mediante vacío y se resuspendió en 25 o 50 μ l de TER, dependiendo del número de copias del plásmido por célula.

GTE: glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM pH 8.

Solución II: NaOH 0,2N, SDS 1% (p/v). Preparar fresca.

Solución III: acetato potásico 3 M ajustado a pH 4,8 con ácido fórmico.

TER: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, ribonucleasa (Roche) 0,02% (p/v).

Alternativamente, se utilizó el kit Nucleospin® (Macherey-Nagel) para obtener ADN plasmídico de alta calidad que pudiera ser empleado en protocolos que requiriesen mayor grado de pureza.

3.1.2. Aislamiento de ADN total de *S. macrogolitabida*

Las extracciones de ADN total de *S. macrogolitabida* se llevaron a cabo según las instrucciones del kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega), partiendo de las células recogidas por centrifugación a 16.100 *g* de 3 ml de cultivo saturado crecido en MML a 30°C .

3.1.3. Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN se resolvieron y visualizaron en geles de agarosa a la concentración adecuada y se purificaron con el kit GFX (GE healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.4. Clonación de fragmentos de ADN

Las endonucleasas de restricción empleadas fueron adquiridas a la compañía Roche, Fermentas o New England Biolabs. En cada caso se siguieron las recomendaciones del proveedor y se empleó el tampón de restricción suministrado por la casa comercial junto a la enzima de restricción.

Las ligaciones se realizaron en tampón quinasa con ATP a una concentración final de 1 mM (en el caso de fragmentos a ligar con al menos un extremo cohesivo) o de 0,1 mM (en el caso de ligación de extremos romos). A cada reacción se añadió 1 unidad de ADN ligasa de T4 (Roche) y se incubó un mínimo de 12 horas a 16 °C.

Tampón quinasa 10x: Tris-HCl 0,5 M pH 7,6, Cl_2Mg 0,1 M, DTT 50 mM, BSA 0,05% (p/v).

3.1.5. Detección de secuencias de ADN por hibridación en membrana (Southern blot)

Para marcar las sondas de ADN se empleó el método no radiactivo de la digoxigenina dUTP (deoxiuridín nucleósido trifosfato) de Roche. Las sondas empleadas consistieron en fragmentos de restricción o de PCR aislados de geles de agarosa. Dichos fragmentos se marcaron mediante el método de cebado aleatorio o *random priming* siguiendo las instrucciones del proveedor del kit.

Para la detección de secuencias de ADN, se realizó una electroforesis convencional en gel de agarosa al 0,7 % (p/v), a 45 V y a 4 °C, en la que se empleó el marcador de tamaño DNA molecular Weight marker III (Roche) marcado con digoxigenina y un total de 2 µg de ADN de las muestras problema. Estos geles fueron tratados según Sambrook y colaboradores (Sambrook, 1989). En primer lugar, se aplicaron las soluciones de despurinización (20 min), desnaturalización (30 min) y neutralización (2 x 15 min).

Posteriormente, la transferencia del ADN desde el gel de agarosa a la membrana de nailon Hybond N (GE Healthcare) se realizó usando el sistema de transferencia semi-seca en pirámide con SSC 10X, durante toda la noche. Una vez transferido el ADN y seca la membrana, se procedió a fijar el ADN por irradiación con luz ultravioleta a 254 nm de longitud de onda durante 15 segundos.

La membrana se prehibridó un mínimo de 1 h a 42 °C en solución de prehibridación precalentada 10 minutos a 65 °C. La hibridación posterior se llevó a cabo durante unas 14 horas a 42 °C en solución de prehibridación, a la que se añadió la sonda precalentada a 100 °C. Posteriormente, se hicieron dos lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente con SSC 2X, SDS 0,1 % (p/v) a los que siguieron otros dos lavados de 15 minutos cada uno con SSC 0,1X, SDS 0,1 % (p/v) a 68 °C.

La detección de señal se llevó a cabo mediante un anticuerpo anti-digoxigenina-dUTP conjugado con fosfatasa alcalina. Todos los pasos siguientes se realizaron a temperatura ambiente y en agitación. La membrana se equilibró con Tampón 1, incubándola 1 minuto en esta solución. A continuación, se bloqueó durante al menos 30 minutos en solución de bloqueo, tiempo tras el cual se añadió el anticuerpo (1 µl por cada 10 ml de solución de bloqueo) y se dejó incubar durante 30 minutos. Después de esto, se eliminó la solución con el anticuerpo y la membrana se lavó dos veces con Tween 20 al 0,3 % (v/v) en Tampón 1. Tras los lavados, la reacción de la fosfatasa se puso de manifiesto empleando CSPD® (Roche), sustrato luminiscente de la fosfatasa alcalina. La membrana se usó posteriormente en el sistema de imagen ChemiDoc™ (BioRad) para poder visualizar el patrón de bandas luminiscentes.

Solución de depurinización: HCl 0,25 M.

Solución de desnaturalización: NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M.

Solución de neutralización: Tris-HCl 1 M, NaCl 1,5 M, pH 7,4.

SSC20X: NaCl 175 g/l, Citrato sódico ·2H₂O 88 g/l, ajustar a pH 7 con HCl 1 M.

Solución de prehibridación: SSC 5X, N-laurilsarcosina 0,1% (p/v), blocking reagent 1% (p/v) (Roche), formamida 50% (v/v), ADN de esperma de salmón 0,05 mg/l). El ADN de esperma de salmón debe añadirse en el momento de usar la solución, previamente hervido durante 10 minutos.

Tampón 1: Ácido Maleico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5.

Solución de bloqueo: Blocking reagent (Roche) al 10 %(p/v) en Tampón 1.

3.1.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones en cadena de la polimerasa para amplificar secuencias de interés fueron realizadas con la enzima EcoTaq DNA Polymerase (Ecogen) o con la iPfu Polymerase (Thermo Scientific), en función de la calidad del producto de PCR requerido. En determinadas ocasiones se utilizó el kit Illustra™ PureTaq™ Ready-to-Go™PCR beads (GE Healthcare). Las mezclas de reacción se realizaron normalmente en un volumen final de 25 o 50 µl, usando 20 ng de ADN molde, oligonucleótidos a concentración final de 1 µM, dNTPs a una concentración final del 50 µM y 2-4 unidades de la polimerasa en el tampón proporcionado por la casa comercial (con el Mg²⁺ necesario ya incorporado). En ocasiones se usó como molde ADN procedente de células hervidas: cuando se trataba de *E. coli*, la biomasa procedente de una colonia aislada se depositó directamente en la mezcla de reacción previamente preparada en frío. En caso de tratarse de una estirpe de *S. macroglotabida*, la colonia se resuspendió en 50 µl de H₂O estéril y se calentó a 95 °C durante 10 min. Pasado este tiempo, la mezcla se centrifugó y se usaron 5 µl del sobrenadante como molde para la reacción de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Biometra T personal usando un programa acorde a los oligonucleótidos que se iban a utilizar, el tamaño del fragmento que se quería amplificar y la finalidad del experimento. Los oligos usados durante este trabajo fueron sintetizados por la empresa Sigma y sus características principales se detallan en la tabla 4.

Tabla 4 Oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR para clonaciones

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Diana
137-BamHI-STOP	ATAGGGAGGATCCTTTAGGTGAATAAG	Gen <i>fixJ1</i>
137-STOP-EcoRI	TCGCGGAATTCCCTTGATCACATCATGTTAGCGCCC	Gen <i>fixJ1</i>
L245_SmaI	CCCGGGGCTGGTGCATCCCGATCCCGAAG	Secuencia aguas arriba de <i>fixJ2</i>
L245_BamHI	GGATCCCCCGCTCCTCCGCTTTCGCGCTCA	Secuencia aguas arriba de <i>fixJ2</i>
R245_BamHI	GGATCCCTGGGAACCCCGACGCTTGCGG	Secuencia aguas abajo de <i>fixJ2</i>
R245_XbaI	TCTAGAGACGGACGCCTCGCAAATCGCG	Secuencia aguas abajo de <i>fixJ2</i>

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Diana
bphPQ1_1	TTTTTGGTACCAACTGGCGCGATTGAAGATC	Secuencia aguas arriba de <i>fixL1</i>
bphPQ1_2	TTTTTGGATCCAAGCCGGGCATGGATCGAAC	Secuencia aguas arriba de <i>fixL1</i>
bphPQ1_3	TTTTTGGATCCGGATCGGGACACTTACGTAG	Secuencia aguas abajo de <i>fixJ1</i>
bphPQ1_4	TTTTTCTAGATGTCTCACCAGTGATCGGCA	Secuencia aguas abajo de <i>fixJ1</i>
Mut_bphPQ2_Fw	TTTTTGGTACCTAATAGAGGCGGTAGGCAAAG	Secuencia aguas arriba de <i>fixL2</i>
Mut_bphPQ2_Rv	TTTTTGGATCCAATTCGCCATCCGCACCGCGG	Secuencia aguas arriba de <i>fixL2</i>
CarD-L1-SacI	GAGCTCAGCAACGGTCCATGGCGCGG	Secuencia aguas arriba de <i>cdnL</i>
CarD-L2-B+1+atg	GGATCCTCATACCCGCCGCGATTCCGACAAG	Secuencia aguas arriba de <i>cdnL</i>
CarD-R1-B+1+stop	GGATCCCTGAGCAAGTTCCTTTCTGTGGC	Secuencia aguas debajo de <i>cdnL</i>
CarD-R2-EcoRV	GATATCTGTCGTGATAGCCGATCAG	Secuencia aguas abajo de <i>cdnL</i>
Cond_CarD_Fw	TATATAATCGATATCTATCATCAGCCGACAG	Gen <i>cdnL</i>
Cond_CarD_Rv	TATATACTCGAGGGTCGGGACGCGCAGGGTCAT	Gen <i>cdnL</i>
Psal_BamHI_EcoRV	ATATAGGATCCAAGATATCGAAGCTTGCATGCCAATT CGC	Secuencia nasF
Psal_2_BamHI_EcoRV	ATATAGGATCCAAGATATCGATGGCTTTATTGATGACT TG	Secuencia Psal
Psal_BamHI	ATATAGGATCCGAATTCGAGTGAATAAAAGG	Secuencia nasF
CBS-L1-SacI	GAGCTCGCGATTACCTCGATCCGGAT	Secuencia aguas arriba del gen <i>cbs</i>
CBS-L2-B+1+atg	GGATCCTCATTCCTGCCGCTCCCACCAT	Secuencia aguas arriba del gen <i>cbs</i>
CBS-R1-B+1+stop	GGATCCATATCGCATCGACAAGATCGA	Secuencia aguas abajo del gen <i>cbs</i>
CBS-R2-EcoRV-#2	GATATCGTTCCTCGCGCAGATCTTCAT	Secuencia aguas abajo del gen <i>cbs</i>
HPrK_1	AAAAAGGTACCACCCTGTGGATCGGCACGCGCA	Secuencia aguas arriba del gen <i>hprK_relA</i>
HPrK_2C	ATATAGGATCCGCGCGTTCCATGTCTCACAC	Secuencia aguas arriba del gen <i>hprK_relA</i>

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Diana
HPrK_3D	ATATAGGATCCGACAGCGCCACCGGCATGGCGC	Secuencia aguas abajo del gen <i>hprK_relA</i>
HPrK_4	AAAAATCTAGAATCGCGCGTCAGGCAGTGGAA	Secuencia aguas abajo del gen <i>hprK_relA</i>
HPr_R_Fw	ATATAGGTACCGCGCAATCCGCACTGGGACC	Secuencia aguas arriba del gen <i>hpr</i>
HPr_R_Rev	ATATAGGATCCGGTCTCCGACGCTTCGCTCAT	Secuencia aguas arriba del gen <i>hpr</i>
HPr_L_Fw	ATATAGGATCCTGACGGGCGCCATTCCGCATTG	Secuencia aguas abajo del gen <i>hpr</i>
HPr_L_Rev	ATATATCTAGAGCTTCCACCGACCAGGGATCG	Secuencia aguas abajo del gen <i>hpr</i>
hprK2_F1_BH	ATATAGGATCCGAGCTCAAGAATCCGATCGC	Secuencia aguas arriba del gen <i>hprk</i>
hprK2_R1_HD	ATATAAGCTTGACGATCTCTGGCACGGTCC	Secuencia aguas arriba del gen <i>hprk</i>
hprK2_F2_HD	ATATAAGCTTCTCGACCGCCTGGCGACC	Secuencia aguas abajo del gen <i>hprk</i>
hprK2_R2_BH	ATATAGGATCCGAAGGTGACGAACCTGGCGC	Secuencia aguas abajo del gen <i>hprk</i>
r519	GTATTACCGCGGCTGCTG	ADN ribosómico
f27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	ADN ribosómico
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	Secuencia flanqueante del MCS de pSK II (+)
T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	Secuencia flanqueante del MCS de pSK II (+)
M13Fwd	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC	Secuencia flanqueante del MCS de pEX18Tc
M13Rv	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	Secuencia flanqueante del MCS de pEX18Tc

3.1.7. Secuenciación

Las reacciones de secuenciación de ADN para la confirmación de mutaciones o ausencia de ellas fue llevada a cabo por la empresa Secugen, usando como molde productos de PCR o preparaciones de ADN plasmídico. Para la comparación de las secuencias con las bases de datos y el análisis de las pautas abiertas de lectura se utilizó el

paquete de herramientas BLAST (Altschul *et al.*, 1997) disponible en la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Para alinear secuencias se usó el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) utilizando los parámetros predeterminados.

3.1.8. Construcción de mutantes de inserción, delección o sustitución

Para la construcción de mutantes de inserción, se emplearon plásmidos basados en pBluescript II SK+ (no replicativo en TFA) portando parte de la secuencia codificante del gen de TFA que se quería interrumpir. El plásmido fue introducido en TFA mediante electroporación o conjugación (en el caso en que se añadió un oriT) y se seleccionaron candidatos Str^r Ap^r en placas de medio rico MML. Para el trabajo de esta Tesis solo se empleó un plásmido de estas características, cuya construcción se detalla a continuación.

pMPO1127: contiene un fragmento con las 465 primeras pb del gen *fixJ_1*, que fue obtenido mediante amplificación por PCR con los oligos “137-BamHI-STOP” (forward) y “137-STOP-EcoRI” (reverse) sobre ADN genómico de TFA. El oligonucleótido *forward* introduce un desfase en la pauta abierta de lectura y codones de stop en las 3 fases (se sustituye la secuencia silvestre TTATGGAGGATAAG por la secuencia TTTTAGGTGAATAAG). El oligonucleótido *reverse* introduce otros 3 codones de STOP (se sustituye la secuencia CGAACAGGATGTGCTCAAGG por CTAACATGATGTGATCAAGG). El producto de PCR se cortó con BamHI + EcoRI y se clonó en pBluescript SK II en las mismas dianas. Finalmente, se añadió un oriT (obtenido de pMPO579 por restricción con HpaI) en la diana EcoRV. El plásmido pMPO1127 se empleó para la construcción de los mutantes MPO801 (*fixJ_1::bla*) y MPO804 (*fixJ_1::bla*, Δ *fixJ_2::km*).

Para la construcción de mutantes de delección o sustitución en el cromosoma de *S. macrogolitabida*, se emplearon plásmidos basados en el plásmido suicida pEX18Tc (Hoang *et al.*, 1998), incapaces de ser replicados dentro de la bacteria. El plásmido pEX18Tc porta el gen *sacB*, cuya expresión resulta letal para aquellas bacterias que se cultivan en medio con sacarosa.

Para la construcción de los plásmidos, se clonaron en el sitio múltiple de clonación de pEX18Tc, dos fragmentos de ADN de TFA (de aquí en adelante denominados “flanqueantes”) pertenecientes a las secuencias inmediatamente aguas arriba e inmediatamente aguas abajo de aquella que se quería deleccionar. En los casos en los que

el gen deletado fuera a ser reemplazado en el cromosoma por el gen codificante para una resistencia a antibiótico (caso de los mutantes MPO803, MPO804, MPO808, MPO811, MPO812, MPO815, MPO816 y MPO824), se clonó a su vez en el plásmido, el gen de resistencia a ampicilina o a kanamicina entre los dos fragmentos flanqueantes.

Una vez contruidos los plásmidos, estos se conjugaron en *S. macroglutabida* y se seleccionaron candidatos Str^r Tc^r (y Km^r o Ap^r, en su caso) tras un mínimo de 5 días de crecimiento en placa de MML sin sacarosa. Dichos clones debían haber integrado el plásmido en el cromosoma gracias a uno de los dos eventos de recombinación posibles, lo que se confirmó en todos los casos por PCR. Tras comprobar los candidatos, varios de ellos se cultivaron durante 3 días en MML líquido sin tetraciclina y se volvieron a sembrar en placas de MML, esta vez conteniendo sacarosa al 10 %. Tras otros 5 días de crecimiento, se seleccionaron los candidatos Str^r Sac^r (y Km^r o Ap^r, en su caso). Los clones que efectivamente habían sufrido el segundo evento de recombinación y que, por tanto, habían perdido el plásmido dando como resultado la sustitución del gen silvestre por el de resistencia a antibiótico, se comprobaron de nuevo por ausencia de crecimiento en tetraciclina, así como por PCR y por Southern blot.

A continuación se detalla la construcción de los plásmidos empleados para este tipo de mutantes:

pMPO1125: las flanqueantes (de 700 y 803 pb) del gen *cdnL* se obtuvieron por PCR sobre ADN genómico de TFA empleando las parejas de oligonucleótidos “CarD-L1-SacI” + “CarD-L2-B+1+atg” y “CarD-R1-B+1+stop” + “CarD-R2-EcoRV”, respectivamente. La resistencia a kanamicina se escindió con BamHI del plásmido pMPO284 y se clonó, junto a los otros 2 fragmentos, en la diana SmaI de pEX18tc. Este plásmido se empleó para el intento de construcción del mutante $\Delta cdnL::Km$.

pMPO1126: las flanqueantes (de 700 y 791 pb) del gen *cbs* se obtuvieron por PCR sobre ADN genómico de TFA con los oligonucleótidos “CBS-L1-SacI” + “CBS-L2-B+1+atg” y “CBS-R1 #4” + “CBS-R2 #2”, respectivamente, y se clonaron independientemente en el sitio EcoRV del plásmido pBluescript II SK+, de donde se escindieron como fragmentos flanqueados por las dianas HindIII y BamHI y BamHI y EcoRV, respectivamente. El gen codificante de la resistencia a kanamicina se obtuvo de pMPO284 cortando con BamHI.

Los tres fragmentos se clonaron en pEX18tc previamente cortado con HindIII y SmaI. Este plásmido se empleó para la construcción del mutante $\Delta cbs::Km$.

pMPO1128: las flanqueantes (de 600 y 500 pb) del gen *fixJ_2* se obtuvieron por PCR sobre ADN genómico de TFA con los oligonucleótidos “L245_SmaI” + “L245_BamHI” y “R245_BamHI” + “R245_XbaI”, respectivamente. La kanamicina se obtuvo por restricción con BamHI de pMPO284. Los tres fragmentos se clonaron en pEX18tc previamente cortado con SmaI y XbaI. Este plásmido se empleó para la construcción de los mutantes MPO803 ($\Delta fixJ_2::km$) y MPO804 (*fixJ_1::bla*, $\Delta fixJ_2::km$).

pMPO1131: las flanqueantes (de 714 y 500 pb) del operón *fixLJ_2* se obtuvieron por PCR sobre ADN genómico de TFA con los oligonucleótidos “Mut-bphPQ2_Fw” + “Mut_bphPQ2_Rv” y “R245_BamHI” + “R245_XbaI”, respectivamente. La kanamicina se obtuvo por restricción con BamHI de pMPO284. Los 3 fragmentos se clonaron en pEX18tc previamente cortado con KpnI y XbaI. Este plásmido se empleó para la construcción de los mutantes MPO808 ($\Delta fixLJ_2::km$) y MPO812 (*fixLJ_1::bla*, $\Delta fixLJ_2::km$).

pMPO1142: las flanqueantes (de 700 y 800 pb) del operón *fixLJ_1* se obtuvieron por PCR sobre ADN genómico de TFA con los oligos “bphPQ1_1” y “bphPQ1_2” y “bphPQ1_3” y “bphPQ1_4”. Los productos de PCR se cortaron con KpnI + BamHI y BamHI + XbaI, respectivamente, y se clonaron en las dianas KpnI + XbaI de pEX18tc. El plásmido resultante se cortó con BamHI, se romizó y se clonó un gen de resistencia a ampicilina (obtenido previamente por PCR sobre pMPO494 con los oligos “Ap fwd” y “Ap rev”). El plásmido pMPO1142 se empleó para la construcción de los mutantes MPO811 (*fixLJ_1::bla*) y MPO812 (*fixLJ_1::bla*, $\Delta fixLJ_2::km$).

pMPO1132: como flanqueantes se emplearon 822 pb de la región aguas arriba de *hprK_rel_A* (incluyendo las primeras 20 pb de la región codificante) y 761 pb de la región aguas abajo del mismo gen (incluyendo 57 pb del final codificante). Estos fragmentos fueron obtenidos por PCR sobre ADN genómico de TFA con los oligos “HPrK_1” + “HPrK_2C” y “HPrK_3D” + “HPrK_4”. Los productos de PCR se cortaron con KpnI + BamHI y con BamHI + XbaI, respectivamente y se clonaron en pBluescript SKII en las dianas KpnI + XbaI, manteniéndose la pauta de lectura entre ellas. El fragmento completo (1589pb) conteniendo ambas flanqueantes se escindió por restricción con SacI y digestión

parcial con KpnI y se clonó en las mismas dianas de pEX18Tc. El plásmido pMPO1132 se empleó para la construcción del mutante MPO809 ($\Delta hprK_relA$).

pMPO1148: como flanqueantes se emplearon 1280 pb de la región aguas arriba de *hprK* (incluyendo las primeras 15 pb de la región codificante) y de 1494 pb de la región aguas abajo del mismo gen (incluyendo 27 pb del final codificante). Estos fragmentos se obtuvieron por PCR sobre ADN genómico de TFA con los oligos “hprK2_F1_BH” + “hprK2_R1_HD” y “hprK2_F2_HD” + “hprK2_R2_BH”, respectivamente. El producto de ambas PCR se cortó con HindIII y BamHI y se clonaron juntas en pBluescript II SK+ en la diana BamHI, obteniéndose una delección en fase de 387 nucleótidos. A continuación, el plásmido se cortó con NcoI, diana en la que se clonó el gen de resistencia a gentamicina escindido (con la misma diana) de pUC18Sfil-miniTn7-BB-Gm. El gen de resistencia a kanamicina se aisló como un fragmento BamHI de pMPO284, se romizó y se clonó en el plásmido anterior cortado con NdeI y romizado, obteniéndose el plásmido pMPO1147. El inserto total de este plásmido se escindió con BamHI y se clonó en la misma diana de pEX18Tc, dando lugar al plásmido pMPO1148. Este plásmido se empleó para la construcción del mutante MPO824 ($\Delta hprK$, $\Delta hprK_relA::km,gm$).

pMPO1146: las flanqueantes (800 y 700 pb) del gen *hpr* se obtuvieron por PCR sobre ADN genómico de TFA con los oligos “HPr_R_Fw” + “HPr_R_Rev” y “HPr_L_Fw” + “HPr_L_Rev”, respectivamente. El fragmento de la región aguas arriba se cortó con KpnI y BamHI y el de la región aguas abajo, con BamHI y XbaI, y se clonaron junto al gen de resistencia a kanamicina (escindido con BamHI de pMPO284) en pEX18tc cortado con KpnI y XbaI. El plásmido pMPO1146 se empleó para la construcción del mutante MPO815 ($\Delta hpr::km$).

3.1.9. Construcción de mutantes condicionales.

En el caso del estudio del gen *cdnL* de *Sphingopyxis macrogolitebida* fue necesaria la construcción de mutantes condicionales debido a la inviabilidad del mutante de delección.

Para la regulación del nivel de expresión de este gen, se empleó un promotor regulable por salicilato (*PsaI*), el gen codificante del activador transcripcional NahR bajo su promotor *Pnah* (Cebolla *et al.*, 2002, Cebolla *et al.*, 2001) y el atenuador transcripcional *nasF* (Lin *et al.*, 1996, Chai *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 1999). El promotor *PsaI* y el gen del activador NahR provienen del plásmido NAH7 de *Pseudomonas putida*. En esa bacteria, el regulador NahR, únicamente en presencia de salicilato, refuerza la transcripción tanto de los genes de

degradación de naftaleno expresados desde el promotor *Psal* como de su propia expresión desde el promotor *Pnah*. Esto implica, que, en presencia del inductor, la expresión de los genes aguas abajo de *Psal* se ve fuertemente incrementada. Por el contrario, la expresión desde el promotor *Psal* en ausencia de salicilato se mantiene en niveles basales. El elemento *nasF*, por su parte, es un atenuador transcripcional implicado en la regulación del operón *nasF* de *Klebsiella oxytoca*.

Para la expresión controlada del gen *cdnL* se empleó una combinación de estos elementos con la intención de expresar el gen bajo el promotor *Psal*, en lugar de bajo su propio promotor, manteniendo además en *cis* el gen del activador NahR para potenciar la expresión de CdnL al añadir salicilato y añadiendo finalmente un atenuador *nasF* entre el promotor *Psal* y el gen *cdnL*. La utilidad de este último elemento sería la de disminuir los niveles de transcripción *cdnL* en presencia de salicilato, evitando que un posible exceso de expresión provocara algún efecto negativo, y la de conseguir unos niveles basales de expresión casi inexistentes en ausencia del inductor. Puesto que no era posible prever los niveles exactos de expresión *cdnL* en la construcción que simularían su delección ó su expresión silvestre, se generaron 2 construcciones como las descritas pero con presencia o ausencia del elemento *nasF*.

Para la integración de este sistema de expresión condicional en el cromosoma, se emplearon los plásmidos pMPO1130 y pMPO1141 (basados en pbluescript y, por lo tanto, no replicativos en *S. macroglotabida*) portando las construcciones que se detallan a continuación y que se resumen en la figura 15A.

pMPO1130: el fragmento conteniendo los elementos *nasF-nahR-Psal-nasF* se escindió de pMPO364 por restricción con Sfil y se clonó como en la diana SmaI de pBluescript II SK+. Se clonó un oriT (escindido de pMPO579 con HpaI) en la diana SpeI romizada del mismo vector. Finalmente, se insertó el fragmento de *cdnL* (364 pb), amplificado desde ADN genómico de TFA con los oligos “Cond_CarD_Fw” + “Cond_CarD_Rv”, en todo el esqueleto anterior abierto por las dianas ClaI y XhoI.

pMPO1141: el fragmento *nasF-nahR-Psal* se amplificó desde pMPO364 usando los oligos “Psal_2_BamHI_EcoRV” y “Psal_BamHI”. El producto de PCR se cortó con las enzimas BamHI y EcoRV y se clonó en las misma dianas de pMPO1130, sustituyéndose el fragmento *nasF-nahR-Psal-nasF* por el que solo contenía *nasF-nahR-Psal*.

Los plásmidos se introdujeron por conjugación o electroporación en TFA. En ambos casos se procedió a la selección de candidatos en placas de medio rico con estreptomicina, ampicilina y salicilato en varias concentraciones: 0, 2 o 3 mM. La integración de los plásmidos mediante un único evento de recombinación homóloga con el principio de *cdnL*, debía dar lugar a dos versiones del gen en el cromosoma (Fig. 15B): una bajo su propio promotor pero incompleta (manteniendo sólo 165 pb de las 531 pb codificantes) y otra con su secuencia codificante completa pero bajo el control del promotor *Psal*.

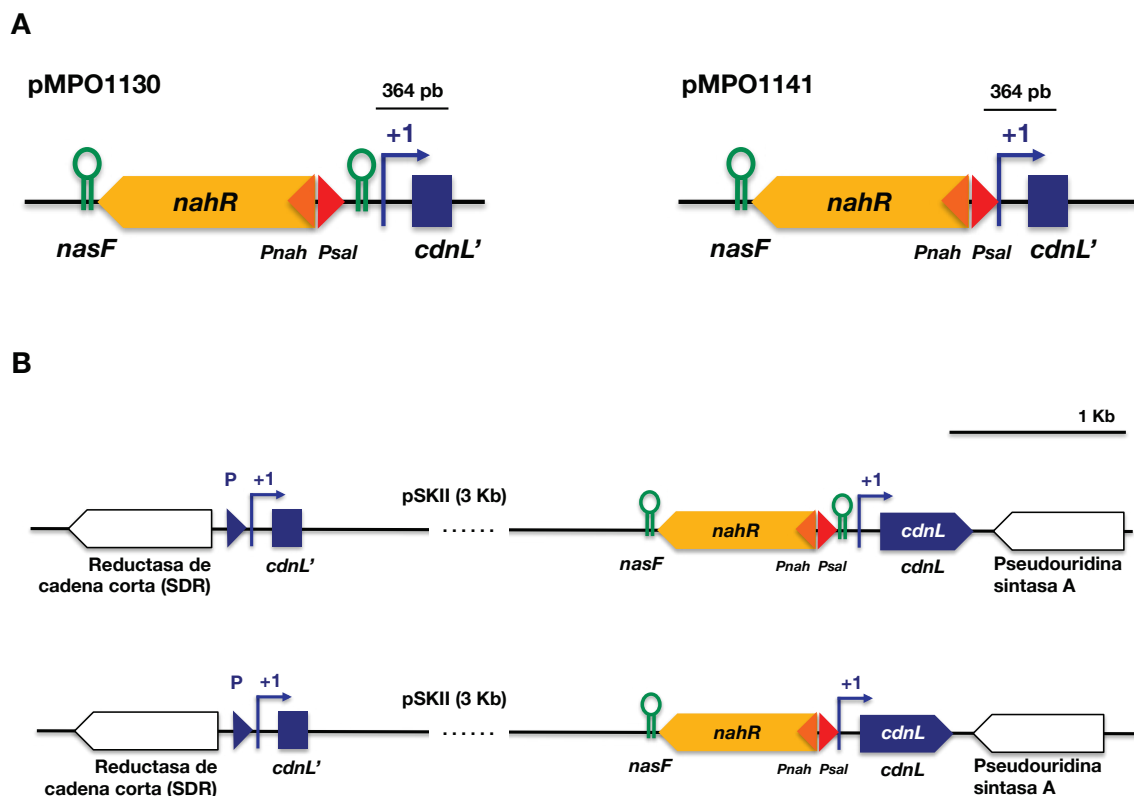


FIG 15. Construcción del mutante condicional en *cdnL*. A. Plásmidos pMPO1130 y pMPO1141. Ambos plásmidos (basados en pbluescript) portan una o dos copias del atenuador de la transcripción *nasF*, el gen para el activador transcripcional *NahR* (que actúa sobre los promotores *Psal* y *Pnah* en presencia de salicilato) y el fragmento de 364pb de *cdnL* usado para la recombinación homóloga (incluye su propio +1 y SD, pero no el promotor original). B. Organización génica en los mutantes condicionales esperados tras la integración de los plásmidos pMPO1130 o pMPO1141: la integración de uno u otro plásmido daría lugar a dos versiones del gen en el cromosoma: una bajo su propio promotor pero incompleta (manteniendo sólo 165 pb de las 531 pb codificantes) y otra con su secuencia codificante completa pero bajo el control del promotor *Psal*.

3.2. Manipulación de ARN

3.2.1. Aislamiento de ARN de *Sphingopyxis macrogolitabida*

Para el aislamiento de ARN, los cultivos de las distintas estirpes de *S. macrogolitabida* fueron enfriados en hielo y las células recogidas mediante centrifugación a 9790 *g* y 4 °C. Para cada extracción se partió de la biomasa correspondiente a 10 ml de cultivo a DO₆₀₀ entre 0,6 y 1, según la necesidad de cada experimento.

El sedimento de células se resuspendió en 1,5 ml de Tripure Isolation Reagent (Tri Reagent LS, Molecular Research Centre) y la mezcla se incubó 10 min a 60 °C, mezclando por inversión, para lisar las células. La mezcla lisada fue centrifugada a 16.100 *g* durante 10 min a 4 °C para separar los restos celulares. El sobrenadante se transfirió entonces a un tubo Phase Lock (Phase lock gel heavy 2 ml, Prime) precompactado, al que se añadieron 200 µl de cloroformo. Tras homogeneizar, la muestra se mantuvo 15 minutos en hielo y se centrifugó a 16.100 *g* durante 15 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se extrajo mediante la adición de 400 µl de fenol:cloroformo 1:1 al mismo tubo y su posterior centrifugación a 16.100 *g*, 5 minutos y 4 °C. La muestra se transfirió entonces a un nuevo tubo al que se añadió 750 µl de isopropanol. Tras incubar 10 minutos en hielo, las muestras se centrifugaron (16.100 *g*, 10 min, 4 °C) y el precipitado obtenido se lavó con etanol al 70 % (v/v). Posteriormente, la muestra se secó al aire y se resuspendió en 150 µl de H₂O fría tratada con dietilpirocarbonato (DEPC; compuesto que inactiva las RNasas)

La muestra resuspendida se trató con DNasa I para eliminar posibles trazas de ADN, utilizando para ello el kit DNA free (Ambion) y siguiendo las instrucciones del proveedor. Para descartar la presencia de ADN contaminante, se realizó una PCR con los oligonucleótidos f27 y r519 (Hugenholtz *et al.*, 1998) específicos del gen codificante para RNA ribosómico 16S de bacterias y se comprobó la no aparición de producto de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa.

Por último, las muestras de ARN obtenidas por el procedimiento descrito se purificaron usando el kit RNeasy mini kit (Quiagen) y se eluyeron en 50 µl de H₂O tratada con DEPC.

La integridad y calidad del ARN se comprobaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v) y haciendo uso del sistema automatizado de electroforesis Experion™ de Biorad, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.2. Obtención de cDNA

La retrotranscripción de ARN total (10 µg) se llevó a cabo con el kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems), que usa como cebadores una mezcla de hexámeros aleatorios. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 µl y se aplicó el programa recomendado por el fabricante (10 minutos a 25 °C y 2h a 37 °C). El ADNc obtenido se limpió con el kit Quiaquick (Quiagen) y se eluyó en 50 µl de H₂O. Para cuantificar la cantidad de ADNc obtenida, se midió la absorbancia de las muestras a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, que calculó la concentración aplicando un coeficiente de extinción de 33 ng cm µl⁻¹.

3.3. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La electroforesis convencional en gel de agarosa se empleó para determinar el perfil de bandas tras la digestión de plásmidos, comprobar la eficiencia de las extracciones de ADN ó ARN, preparar fragmentos de ADN para la hibridación en membrana, visualizar productos de PCR, etc. Normalmente se empleó agarosa de baja electroendósmosis. La concentración de la agarosa osciló entre 0,6 y 1 % (p/v) en tampón TAE 1X, según el tamaño de los fragmentos de ADN a separar. Como patrón de peso molecular estándar se usó el marcador 1 kb ladder (Invitrogen). Para cargar las muestras en el gel, se les añadió tampón de carga 6X. La diferencia de potencial a la que se corrieron los geles varió entre 50 y 135 V.

En el caso de las muestras de ARN, se empleó material y soluciones tratados con DEPC y libres de RNasa.

Para visualizar el ADN tras la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a 2,5 mg/l. Los geles teñidos se iluminaron con un transiluminador de radiación ultravioleta (Vilber Lourmat) y se registraron con un analizador de imágenes.

Tampón de carga 6X: azul de bromofenol 0,05% (p/v), xileno de cianol 0,05% (p/v), glicerol 30% (v/v), TE 50X 2% (v/v)

TAE 1X: Tris-ácido acético 40 mM, EDTA 10 mM, pH 7,7.

3.4. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para cuantificar las distintas preparaciones de ADN de doble cadena (ADN plásmidico, fragmentos de ADN purificados, ADN total, etc.) se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, que calculó la concentración aplicando un coeficiente de extinción de 50 ng cm μl^{-1} . En el caso de las muestras de ARN, las medidas se efectuaron en el mismo aparato pero aplicando un coeficiente de extinción de 40 ng cm μl^{-1} .

4. Manipulación de proteínas

4.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS monodimensionales

Se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida monodimensionales bien para confirmar *a visu* las cuantificaciones de los extractos de proteínas o bien para visualizar la correcta resolución y la concentración uniforme de los extractos en todos los carriles de geles que fueran a ser empleados posteriormente en ensayos de Western blot.

La electroforesis en estos geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS al 0,1 % (p/v), se realizó en base al método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Para ello, se emplearon geles discontinuos consistentes en un gel superior de empaquetamiento y un gel inferior de separación. Las electroforesis se corrieron a 30 mA por gel en tank buffer 1X. En caso necesario, los geles se tiñeron con el reactivo EZ-Blue (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante o con plata según Heukeshoven y Dernik (Heukeshoven *et al.*, 1985). Finalmente, los geles se secaron en un secador Hoefer™ Slab Gel Dryer CD 2000 (GE healthcare)

Gel de empaquetamiento: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 0,04% (p/v), acrilamida:bisacrilamida (36,5:1) 1,8% (p/v), persulfato amónico 0,04% (p/v), TEMED 0,04% (p/v).

Gel de separación: Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1% (p/v), acrilamida:bisacrilamida (36,5:1) 12,5% (p/v), persulfato amónico 0,05% (p/v), TEMED 0,075% (p/v).

Tampón de carga 2X: Tris-HCl 160 mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v), b-mercaptoetanol 10% (v/v).

Tampón de carrera: 1X: Trizma base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v).

4.2. Electroforesis de proteínas marcadas con fluoróforos en geles de poliacrilamida-SDS bidimensionales (2D-DIGE).

Para el análisis comparativo del proteoma de *S. macrogolitabida* en dos condiciones metabólicas distintas, se empleó el marcaje de las proteínas totales con fluoróforos y su resolución en geles de poliacrilamida bidimensionales.

Los equipos y reactivos específicos empleados fueron suministrados por GE Healthcare, salvo que se indique lo contrario.

4.2.1. Obtención y limpieza del extracto total de proteína

Se emplearon 4 réplicas biológicas independientes de cultivos de *S. macrogolitabida* de un volumen total de 10 ml, crecidos en condiciones de inducción *thn* (medio mínimo suplementado con tetralina como única fuente de carbono) o en condiciones de represión catabólica (medio mínimo suplementado con tetralina y β hidroxibutirato 40 mM como fuentes de carbono). Los cultivos se recogieron en fase exponencial de crecimiento (cuando la DO_{600} fue de 0,8) por centrifugación a 4 °C y 7660 g durante 15 minutos. Tras esta centrifugación, el pellet de células se resuspendió en 2 ml de tampón fosfato y se volvió a centrifugar a velocidad máxima en una centrífuga de mesa a 4 °C durante 30 minutos.

El pellet de células de los cultivos recogidos se resuspendió en 200 μ l de tampón de solubilización y se rompió con el *PlusOne Sample Grinding Kit* de GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el proceso de rotura, las muestras se limpiaron con el 2-D Clean-Up Kit de GE Healthcare.

Finalmente, el pH de los extractos de proteína total se ajustó a 8,5 empleando tampón Tris-HCl 1,5 M pH 9,5, sin sobrepasar en ningún caso la concentración de 40 mM de Tris en la muestra.

Tampón fosfato: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17 mM, KH_2PO_4 7,35 mM. Autoclavar.

Tampón de solubilización: Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 40 mM.

4.2.2. Cuantificación de la concentración de proteínas en los extractos

La cuantificación de los extractos se llevó a cabo empleando el RC-DC Kit de BioRad y siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando BSA (albúmina de suero bovino) para la recta patrón.

4.2.3. Marcaje de los extractos con fluoróforos

El marcaje de las proteínas necesario para el análisis DIGE se llevó a cabo con los fluoróforos CyDye DIGE Fluor Cy2, Cy3 y Cy5, que generan un marcaje mínimo en el 1- 2 % de los residuos de lisina de las proteínas. Cada análisis DIGE contenía dos muestras (una de cada condición) a analizar. De cada muestra, se marcaron 50 µg de extracto total de proteínas con Cy3 o Cy5, y 25 µg de ambas con Cy2 (muestra que actuaría como estándar interno). El marcaje se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de GE Healthcare.

4.2.4. Resolución en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Se llevaron a cabo 4 réplicas técnicas de la resolución bidimensional del proteoma en gel. Para cada una, se realizaron dos separaciones sucesivas de las proteínas. La primera, en función del punto isoeléctrico (proceso conocido como Isoelectroenfoque: IEF) y la segunda, en función de la masa de las proteínas.

Para el IEF, se utilizaron las tiras de acrilamida Immobiline™ DryStrip de 24 cm de longitud con gradiente de pH no lineal comprendido entre 3 y 7 o entre 3 y 11.

Tras el marcaje ya descrito con los fluoróforos, se mezclaron 50 µg de extracto de proteínas de cada una de las 2 condiciones de cultivo con 50 µg del estándar interno, 9 µl

de DTT 1M, 2,25 µl de IPG y tampón de rehidratación hasta completar un volumen total de 450 µl. Dicha mezcla se aplicó a las tiras de acrilamida (contenidas en un “strip holder”) para proceder con el programa de isoelectroenfoque que se detalla a continuación, en un sistema Ettan IPGphor II (GE Healthcare):

Programa para las tiras de pH no lineal de 3 a 7 (aplicación de 59867 Vh totales)

1. 10 h de rehidratación sin aplicación de voltaje
2. 1 h a 500 V en modo lineal
3. 1,04 h a 1000 V en modo gradiente
4. 3 h a 8000 V en modo gradiente
5. 5,36 h a 8000 V en modo lineal

Programa para las tiras de pH no lineal de 3 a 11 (aplicación de 44750 Vh totales)

1. 10 h de rehidratación sin aplicación de voltaje
2. 1 h a 500 V en modo lineal
3. 1 h a 1000 V en modo gradiente
4. 3 h a 8000 V en modo gradiente
5. 3,45 h a 8000 V en modo lineal

Tampón de rehidratación: urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, azul de bromofenol 0,002% (p/v).

Tras el IEF, se realizó el equilibrado de las tiras de acrilamida. Para ello, se incubaron las tiras durante 15 minutos en agitación y temperatura ambiente en tampón de equilibrado I y durante otros 15 minutos en tampón de equilibrado II. Una vez equilibradas las tiras, se colocaron sobre geles de poliacrilamida-SDS al 12,5% sin gel de empaquetamiento y se sellaron añadiendo por encima solución de sellado. La segunda dimensión se realizó en el equipo Ettan Daltsix Electrophoresis System (GE Healthcare). El tampón de carrera (Tank buffer) fue el mismo que el empleado en la electroforesis monodimensional. Los geles se sometieron a una corriente de 5 W/gel durante 30 min y 17 W/gel durante 4 horas.

Tampón de equilibrado I: Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), DTT 10 mg/mL

Tampón de equilibrado II: Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), Iodoacetamida 25 mg/mL.

Solución de sellado: Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v), agarosa 0,5% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v).

4.2.5. Análisis de los geles 2D-DIGE mediante el programa DeCyder

Los geles se escanearon en un escáner Typhoon™ 9400 para detectar la fluorescencia emitida por cada fluoróforo. Para la visualización de la fluorescencia se empleó el programa ImageQuant (versión 5.2) y para el análisis cuantitativo, el programa DeCyder Differential 5.01, ambos de GE Healthcare.

4.2.6. Tinción de los geles con plata

Tras el escaneo de los geles, estos fueron teñidos con plata según el protocolo descrito por Heukeshoven y Dernick (Heukeshoven *et al.*, 1985), pero aplicando dos modificaciones que permitirían la posterior identificación de proteínas (Yang *et al.*, 2000). Las modificaciones consistieron en la eliminación del glutaraldehído y de formaldehído de la solución de sensibilización y de la solución de plata, respectivamente.

Para la tinción, el gel se sumergió en solución de fijación durante 30 minutos para fijar las proteínas y eliminar el SDS del gel. A continuación, se retiró la solución de fijación, se añadió solución de sensibilización y se incubó durante 30 minutos. El gel fue entonces lavado 3 veces en abundante agua destilada durante 5 minutos y posteriormente incubado 20 minutos en la solución de plata. Tras eliminar la solución de plata, el gel fue lavado 2 veces durante 1 minuto con agua destilada. Finalmente, se aplicó la solución de revelado el tiempo necesario para visualizar la mayor cantidad posible de proteínas en todo el gel, sin llegar a sobresaturar la tinción para evitar el solapamiento de los spots o a una coloración excesivamente oscura del fondo del gel. Una vez alcanzado el nivel deseado de tinción, se retiró esta última solución y se añadió solución de parada. Pasados 10 minutos, se retiró todo el volumen y se añadió agua bidestilada.

Solución de fijación: etanol 33,3% (v/v), ácido acético glacial 8,3% (v/v)

Solución de sensibilización: etanol 30% (v/v), tiosulfato sódico 0,2% (p/v), acetato sódico 6,8% (p/v)

Solución de plata: nitrato de plata 0,25% (p/v)

Solución de revelado: carbonato disódico 2,5% (p/v), formaldehído 0,0074% (v/v)

Solución de parada: EDTA·2H₂O·Na₂ 1,46% (p/v)

4.2.7. Identificación de las proteínas de interés

El aislamiento de los *spots* de proteínas se realizó sobre los mismos geles de análisis DIGE tras su tinción con plata. La identificación de las proteínas fue realizada en la Unidad de Proteómica de Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Madrid, España). Las identificaciones de las proteínas pudo llevarse a cabo gracias a la secuencia disponible (no publicada) del genoma de *Sphingopyxis macrogolita* TFA.

4.3. Electroforesis de proteínas marcadas con ³⁵S-Metionina en geles de poliacrilamida-SDS bidimensionales

Para el análisis comparativo del proteoma de *S. macrogolita* en 2 condiciones metabólicas distintas a lo largo del tiempo, se empleó el marcaje de las proteínas totales con ³⁵S-Metionina y su resolución en geles de poliacrilamida bidimensionales. El fundamento y los procedimientos generales aplicados fueron muy similares a lo ya descrito para los 2D-DIGE (4.2) con las siguientes modificaciones que se detallan a continuación.

4.3.1. Obtención del extracto total de proteína marcado con ³⁵S-Metionina

Se emplearon 3 réplicas biológicas de cultivos de *S. macrogolita* de un volumen total de 10 ml, crecidos en condiciones de inducción (medio mínimo suplementado con tetralina como única fuente de carbono) y a los que se aplicó el estímulo de represión catabólica (adición de β-hidroxibutirato 40 mM como fuente de carbono) una vez alcanzaron DO₆₀₀ de 0,6. Tras 5, 15 o 30 minutos en presencia de dicha fuente preferencial de carbono y en agitación a 30 °C, se añadieron 0,15 mCi de ³⁵S-Metionina al cultivo y se

dejó incubar otros 10 minutos en las mismas condiciones. Pasado ese tiempo, se añadieron 15 µl de solución de parada y se colocaron las muestras en hielo. Finalmente, los 10 ml de cultivo se centrifugaron durante 5 minutos a 4 °C y 6120 g un total de 3 veces: la primera para eliminar el medio de cultivo y las otras 2 para lavar el sedimento de células con 1 ml de Tris-HCl pH 7,5. La muestra se guardó entonces seca a -20 °C hasta su posterior uso.

Para romper las células se empleó la rotura mecánica usando un Ribolyser. Para ello, cada precipitado de 10 ml de cultivo se resuspendió en 400 µl de tampón TE-PMSF empleando una micropipeta y se transfirió a otro tubo conteniendo aproximadamente 0,25 ml de bolitas de vidrio. La mezcla se agitó algunos segundos en el vórtex para su homogenización. A continuación, los tubos se introdujeron en el Ribolyser y se les aplicó 2 ciclos de agitación durante 20 segundos a 6.800 rpm, interrumpidos por una pausa de 5 minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron a continuación durante 10 minutos a 12.450 g y 4 °C. El sobrenadante resultante de dicha centrifugación fue sometido a otras 2, en las mismas condiciones pero durante 30 minutos cada una. Al cabo de cada centrifugación, el sobrenadante se transfirió siempre a un tubo nuevo.

Solución de parada: Cloranfenicol 0,1% (p/v), Metionina 10 mM, Tris 0,1 M pH 7,5

Tampón TE-PMSF: Tris 10 mM pH 8, EDTA 10 mM, PMSF 0,03 % (p/v)

4.3.2. Cuantificación de la concentración de proteínas en los extractos

La cuantificación de la concentración proteica de los extractos se llevó a cabo usando un espectrofotómetro y empleando la solución Roti®-nanoquant según las instrucciones del fabricante (Roth).

4.3.3. Cuantificación del marcaje radiactivo de los extractos de proteínas

El marcaje radiactivo de las muestras se midió en un contador de centelleo Tri-Carb® 2900TR de la marca Perkin Elmer.

Para ello, se depositó 1 µl de cada extracto de proteínas en un disco de celulosa y se dejó secar 30 minutos bajo una lámpara de infrarrojos. A continuación, se colocaron los discos en un vaso de precipitado de cristal y se empaparon en ácido tricloroacético frío al

10% durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se cambió la solución por otra de ácido tricloroacético al 5% y temperatura ambiente. Dicha solución se aplicó 2 veces durante 15 minutos cada una. Los discos se lavaron entonces en etanol al 96% durante 5 minutos y se dejaron secar. Para efectuar la medida del nivel de radiactividad, los discos se introdujeron en botecitos de cristal, se añadió 1 ml de líquido de centelleo y se procedió a la medida en el contador Tri-Carb® 2900 TR.

4.3.4. Resolución en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Para el IEF, se utilizaron tiras de acrilamida de 18 cm de longitud de la marca SERVA con gradiente de pH comprendido entre 4 y 7.

De cada muestra a analizar se usó el volumen de extracto necesario que contuviera 100 µg de proteínas (o 300 µg de proteínas en el caso de los geles preparativos para el aislamiento de spots de proteínas). A dicha cantidad de extracto se le añadieron 34 µl de Solución CHAPS 10x y el volumen necesario de solución de rehidratación hasta completar un volumen final de 340 µl. La mezcla de todos estos componentes se mantuvo 30 minutos en reposo a temperatura ambiente y, a continuación, se centrifugó durante 4' a velocidad máxima en una centrífuga de mesa. El sobrenadante resultante tras la centrifugación se aplicó finalmente a las tiras de isoelectroenfoque.

El programa configurado en la máquina de IEF para las tiras de pH entre 4 y 7 empleadas fue el siguiente (aplicación de 60000 Vh totales):

1. 18 h de rehidratación sin aplicación de voltaje
2. 1 h a 150 V en modo lineal
3. 1 h a 300 V en modo lineal
4. 1 h a 600 V en modo gradiente
5. 1 h a 1500 V en modo gradiente
6. 19 h a 3000 V en modo gradiente

Solución CHAPS 10x: DTT 3% (p/v), CHAPS 10% (p/v), anfolitos 5,2% (v/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v)

Solución de rehidratación: urea 8M, tiourea 2M.

Tras el IEF se realizó el equilibrado de las tiras de acrilamida. Para ello, se incubaron las tiras durante 15 minutos en agitación y temperatura ambiente en tampón de equilibrado I y durante otros 15 minutos en tampón de equilibrado II.

Una vez equilibradas las tiras, se colocaron sobre geles de acrilamida-bisacrilamida-SDS compuestos por una fase de un par de centímetros de gel de empaquetamiento y otra mayoritaria de gel de separación. Los geles se corrieron a 4 W/gel durante 1 hora y 1,6 W/gel durante toda la noche. La temperatura del tanque en el que corrieron los geles se mantuvo en todo momento a un máximo de 15 °C gracias al uso de un termostato.

Tampón de equilibrado I: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 4% (p/v), DTT 3,5 mg/mL.

Tampón de equilibrado II: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v), iodoacetamida 45 mg/mL.

Tampón de carrera: Tris 0,25 M, glicina 1,9 M, SDS 1% (p/v).

4.3.5. Secado y exposición de los geles de acrilamida

Tras la segunda dimensión, los geles se incubaron durante 1 hora en solución de mantenimiento. Tras ese tiempo, se colocaron sobre papel Whatman y se secaron en una máquina de vacío a 85 °C durante 2,5 horas.

Tras el secado, los geles se expusieron a pantallas “Phosphor Screen” (GE Healthcare) entre 5 y 15 días.

4.3.6. Análisis de los geles radiactivos mediante el programa Delta2D

Las pantallas sensibles a radiación β se escanearon en un escáner Typhoon™. Para el registro de la señal radiactiva se empleó el programa ImageQuant. Las imágenes fueron posteriormente analizadas con el programa Delta 2D (DECODON GmbH, Greifswald, Alemania).

4.3.7. Tinción de los geles con Coomassie

Sólo en el caso de los geles preparativos, empleados para aislar las proteínas de

interés, estos se tiñeron con azul de coomassie.

Para ello, los geles se incubaron inicialmente 1 hora en solución de fijación. Posteriormente, se lavaron 2 veces durante 15 minutos con agua bidestilada y se les aplicó la tinción de coomassie durante toda la noche. Finalmente, los geles se lavaron varias veces con agua bidestilada abundante hasta que la coloración azul del fondo del gel se hizo casi inexistente.

Solución de fijado: etanol 50%, ácido acético 12%, formaldehído 37%.

Tinción coomassie: Coomassie G-250 1,2 g/l, metanol 20% (v/v), ácido fosfórico 10% (v/v), sulfato de amonio 0,76 M.

4.3.8. Identificación de las proteínas de interés

La identificación de las proteínas a partir del fragmento escindido del gel de acrilamida fue realizada por la unidad de espectrometría de masas del Instituto de Microbiología de la Universidad de Greifswald (Alemania). Las identificaciones de las muestras pudo llevarse a cabo gracias a la secuencia disponible (no publicada) del genoma de *S. macrogolitabida* TFA.

4.4. Ensayo de actividad extradiol dioxigenasa

Como medida indirecta del nivel de inducción de los genes *thn*, se empleó un ensayo espectrofotométrico para cuantificar el nivel de actividad extradiol dioxigenasa de los cultivos de TFA, tomando dicha medida como indicación del nivel de actividad de la enzima ThnC implicada en el metabolismo de la tetralina (Andújar y col., 2000). Esta enzima posee la capacidad de transformar el sustrato comercial 2,3- dihidroxibifenilo en 6-fenil-HODA, de tal manera que la cuantificación de la aparición de dicho producto es una medida de su actividad.

Para el ensayo de actividad se emplearon cultivos de TFA de un volumen total de 10ml a una D.O₆₀₀ de aproximadamente 0,8. Dichos cultivos habían sido crecidos en medio mínimo con tetralina (condición de inducción *thn*) ó tetralina y β -hidroxibutirato 40mM (condición de represión catabólica) como únicas fuentes de carbono.

Para recoger las células, los cultivos se centrifugaron durante 15 minutos y 4 °C a 9790 *g*. El sedimento de células se resuspendió en 10 ml (en el caso de los cultivos crecidos en tetralina y β -hidroxibutirato) o 50 ml (en el caso de los cultivos crecidos sólo en tetralina) de tampón fosfato pH 6,8. A continuación, se procedió a la medida de actividad extradiol-dioxigenasa en un espectrofómetro: se registró el nivel de absorbancia a 434 nm de longitud de onda durante 8 minutos y temperatura ambiente tras la adición de 3 μ l del sustrato de la reacción (2,3- dihidroxibifenilo 50mM) a 1 ml de muestra. Como referencia durante todo el transcurso de la medida, se empleó otro volumen de 1 ml de la misma muestra como “blanco” al que no se añadió en ningún momento el sustrato de la reacción.

Para el cálculo de actividad se empleó el coeficiente de extinción molar del 6-fenil-HODA $\lambda_{\text{max}} = 434 \text{ nm}$ $\epsilon = 13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Tampón fosfato: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3% (p/v), K_2HPO_4 5 % (p/v).

5. Análisis de la expresión génica

5.1. Ensayos de actividad β -galactosidasa

5.1.1. Obtención de cultivos para medida de expresión *lacZ* regulada por salicilato.

Para el estudio de la funcionalidad del promotor regulable por salicilato en TFA, se analizó el nivel de expresión del gen *lacZ* de los plásmidos pMPO1129 y pMPO1140 presentes en *trans* en la bacteria. La construcción de estos plásmidos se detalla a continuación.

pMPO1129: el fragmento *nasF-nahR-Psal-nasF* (amplificado sobre pMPO364 con los oligos “Psal_BamHI_EcoRV” + “Psal_BamHI” y cortado con BamHI) se clonó en la diana BamHI de pLAFR3. El gen *lacZ* con su propia Shine-Dalgarno (obtenido de pMPO234 cortando con BamHI y Sall romizado) se insertó en el mismo vector cortado con BamHI y EcoRI (romizada).

pMPO1140: el gen *lacZ* (escindido de pMPO234 con BamHI-Sall romizado) se clonó en las dianas BamHI–EcoRI (romizada) de pLAFR3. El fragmento *nasF-nahR-Psal* (amplificado con los oligos “Psal_2_BamHI_EcoRV” y “Psal_BamHI” desde pMPO364 y cortado con BamHI) se insertó en la diana BamHI del mismo vector.

Las muestras para el ensayo β -galactosidasa se obtuvieron de cultivos de *S. macroglotabida* conteniendo los plásmidos pMPO1129 y pMPO1140 y creciendo en medio mínimo con β HB 40 mM y con/ sin salicilato 2mM. Dichos cultivos se inocularon a D.O.₆₀₀ de 0,1 desde otros pre-cultivos idénticos, pero sin salicilato. Durante todo momento se empleó estreptomycin y ampicilina en el medio para evitar la pérdida de los plásmidos o la aparición de contaminaciones.

La actividad β -galactosidasa de los cultivos finales creciendo en medio mínimo con β HB 40 mM y +/- salicilato 2mM se midió al alcanzar estos D.O.₆₀₀ de 0,8.

5.1.2. Obtención de cultivos para medida de inducción *thn*

Para los estudios de inducción de la expresión de los genes *thn* en *S. macroglotabida* se utilizaron estirpes con fusiones traduccionales *thnB::lacZ* o *thnC::lacZ* en el cromosoma. Estas estirpes se cultivaron en cada una de las siguientes 3 condiciones:

- condiciones de inducción de los genes *thn*: MM con tetralina
- condiciones de represión catabólica: MM con tetralina y β HB 40 mM o MM con tetralina y ácido sebácico 15,9 mM
- condiciones de no inducción de los genes *thn*: MM con β HB 40 mM o MM con ácido sebácico 15,9 mM

Para la obtención de dichos cultivos se emplearon, en primer lugar, pre-inóculos que alcanzaron saturación en MM con β HB 40 mM o con sebácico 15,9 mM. Estos pre-inóculos se utilizaron para inocular otros similares según el esquema de la figura 16, de manera que se garantizara que los cultivos finales eran inoculados a partir de los intermedios en fase exponencial (D.O.₆₀₀ de 0,8).

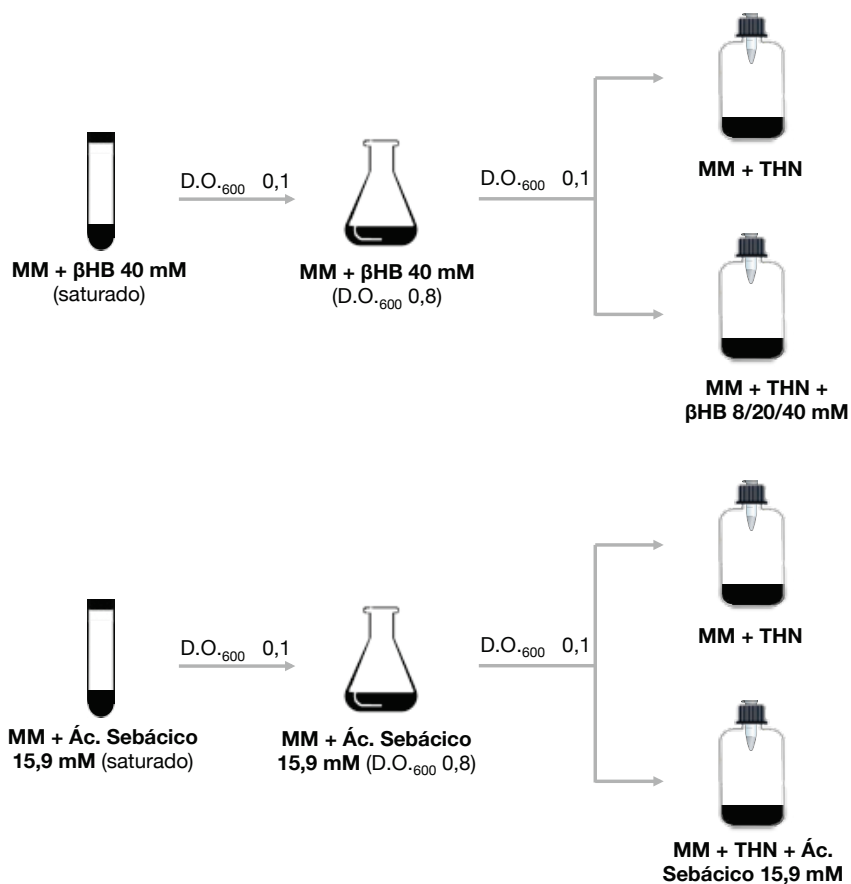


FIG. 16. Obtención de cultivos para ensayos β-galactosidasa. Los cultivos se diluyen dos veces consecutivas para garantizar que los cultivos finales se inoculan a partir de otros en fase exponencial.

En todos los casos en que un cultivo con βHB o ácido sebácico sirviera para inocular otro sin dichas fuentes de carbono o con una concentración más baja del mismo, el volumen de cultivo a utilizar se centrifugó 10 minutos a velocidad máxima en una centrífuga de mesa para eliminar el sobrenadante. El sedimento de células fue entonces resuspendido en tampón fosfato e inoculado en el nuevo medio de cultivo.

Finalmente, para el desarrollo del ensayo β-galactosidasa, se extrajeron alícuotas de los cultivos a diferentes tiempos, tomando como tiempo cero el momento en el que fueron inoculados a D.O.₆₀₀ de 0,1.

Tampón fosfato: Na₂HPO₄·12H₂O 17 mM, KH₂PO₄ 7,35 mM.

5.1.3. Desarrollo del ensayo β-galactosidasa

Los ensayos de actividad β-galactosidasa se realizaron según el protocolo descrito

por Miller (Miller, 1972) con algunas modificaciones. Un volumen de 100 µl de una dilución apropiada del cultivo problema se añadió a una mezcla de 655 µl de tampón Z, 20 µl de SDS 0,1% (p/v) y 30 µl de cloroformo. La mezcla se agitó con el vórtex para permeabilizar las células y se incubó 10 minutos a 30 °C en un baño. A continuación, se añadieron 200 µl de solución de ONPG (4 mg/l en tampón Z) a cada muestra y se prosiguió la incubación hasta observar color amarillo en las muestras. Tras el cambio de color, la reacción se detuvo mediante la adición de 500 µl de Na₂CO₃ 1M, homogeneizando con agitación y enfriando en hielo. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 9.300 g y temperatura ambiente para separar el cloroformo y los restos celulares. Finalmente, se midió la absorbancia a 420 nm de la fase acuosa. La actividad se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad } \beta \text{ galactosidasa (en Unidades Miller)} = \frac{A_{420}}{V \text{ DO}_{600} t}$$

A_{420} : Absorbancia de la reacción a 420 nm de longitud de onda.

V: Volumen de cultivo utilizado en la reacción (0,1 ml).

D.O.₆₀₀: Densidad óptica del cultivo a 600 nm de longitud de onda.

t: Tiempo de reacción (minutos).

Tampón Z: Na₂HPO₄ 8,54 g/l, NaH₂PO₄·H₂O 5,5 g/l, KCl 0,75 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,25 g/l, antes de usar, añadir 0,27% (v/v) de β-mercaptoetanol.

5.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Las estirpes cuya expresión génica fuera a ser medida mediante el uso de PCR cuantitativa, fueron cultivadas en matraces con tetralina como única fuente de carbono (figura A). Dichos cultivos se inocularon a 0,1 de D.O.₆₀₀ de a partir de otros en fase exponencial y en presencia de tetralina y βHB 8 mM.

Una vez que los cultivos en matraces alcanzaron una D.O.₆₀₀ entre 0,7 y 0,8 se procedió a la toma de muestras. En primer lugar, se recogieron 8 ml del cultivo en lo que se llamó “tiempo cero”. A continuación, se añadió al matraz βHB a una concentración final de 40 mM, para generar el estímulo de represión catabólica y se recogieron otros 8 ml de

muestra transcurridos 3, 6 o 9 minutos y, en algunos casos, tras 1, 3 y 5 horas después de la adición.

Para recoger los cultivos, los 8 ml se repartieron en 4 tubos de 2 ml cada uno (siempre colocados en hielo) y se introdujeron rápidamente en una centrífuga de mesa, donde se centrifugaron a velocidad máxima durante 30 segundos a 4 °C. Finalmente, el sobrenadante se eliminó volcando los tubos y el sedimento de células se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron entonces a -80 °C hasta su uso.

El mismo procedimiento fue aplicado siempre para al menos 2 réplicas biológicas de cada estirpe a analizar.

Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron usando la tecnología SYBR Green en el sistema ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). El programa configurado en el termociclador y aplicado a las muestras fue el siguiente:

1 ciclo de 2 minutos a 50 °C, para la activación de la polimerasa.

1 ciclo de 10 minutos a 95 °C, para la desnaturalización inicial del ADN molde.

40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, para la desnaturalización del ADN, y 1 minuto a 60 °C, para apareamiento de los oligonucleótidos y extensión.

Después de la amplificación se llevó a cabo una curva de desnaturalización para distinguir el producto de PCR marcado de los productos de amplificación inespecífica. Las curvas se realizaron calentando las muestras desde 80 °C a 95 °C a una tasa de 0,2 °C s⁻¹, haciendo una medición continua de la fluorescencia.

Para cada reacción de PCR cuantitativa se emplearon 10 ng del ADNc obtenido de las muestras problema. Dicho ADNc fue sometido a PCR cuantitativa por cuadruplicado en reacciones independientes usando 0,3 µM de cada oligonucleótido. Todos los productos de PCR se diseñaron con una longitud de entre 50 y 100 pb. Las parejas de oligonucleótidos y sus características se detallan en la tabla 5. Con el objeto de cuantificar la abundancia relativa de los transcritos se realizó una curva estándar usando diluciones seriadas de ADN genómico de *S. macrogolitabida*, desde 2,5 pg hasta 25 ng.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Diana
QRT_OXO_Fw	GATCTCCTCCTATGTCCGGCG	Gen codificante de la subunidad A de la Oxoácido-CoA transferasa de TFA
QRT_OXO_Rv	GCCAGATATTGCCGTTTCGAA	Gen codificante de la subunidad A de la Oxoácido-CoA transferasa de TFA
thnB1Q	CTCGCCTCGGATGACTCAGT	Gen <i>thnB</i> de TFA
thnB2Q	AAGCCGCCATCGGTATTG	Gen <i>thnB</i> de TFA
thnR.1Q	TTCTTCCCTAATTTTCGCTTTTGG	Gen <i>thnR</i> de TFA
thnR.2Q	CATGTCAGCTTTACGACGATAAGG	Gen <i>thnR</i> de TFA

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en RT-qPCR

6. Cuantificación de gránulos de PHB en las células

Sphingopyxis macrogoltabida TFA tiene la capacidad de sintetizar y almacenar gránulos de polihidroxibutirato en su citoplasma. En los casos en los que fue necesario, dicha acumulación de gránulos fue cuantificada mediante tinción con el compuesto fluorescente Rojo Nilo (Degelau, 1995, Spiekermann *et al.*, 1999).

Los cultivos empleados para la medida se crecieron en medio mínimo suplementado con tetralina y β -HB 40mM y en presencia de Rojo Nilo (disuelto en dimetilsulfóxido y añadido a los cultivos a una concentración final de 0,5 μ g/ml). En paralelo, se cultivaron las mismas estirpes en el mismo tipo de medio y en las mismas condiciones pero en ausencia de Rojo Nilo. Estos últimos cultivos serían usados para restar, tras las medidas de fluorescencia, el nivel de emisión inherente a las células.

Las medidas de fluorescencia se realizaron 11, 24 y 47 h después de inocular los medios (MM + tetralina + β -HB 40mM + Rojo Nilo) a D.O.₆₀₀ de 0,1 con pre-cultivos crecidos hasta fase exponencial en medio mínimo con β -HB 40mM y Rojo Nilo.

Para el registro de la fluorescencia se empleó el sedimento de un mililitro de los cultivos resuspendido en 150 μ l de tampón fosfato. Dicho volumen se añadió a los pocillos de una placa Microfluor® opaca. Para la medida se empleó un lector de placas POLARstar Omega (BMG LABTECH), donde se configuró un filtro de emisión de 540 nm, un filtro de emisión de 620 nm y una ganancia de 2000. A la medida de fluorescencia de cada muestra le fue restado el valor de fluorescencia emitida por los pocillos vacíos y el valor de fluorescencia de los cultivos crecidos en ausencia de Rojo Nilo, descartando así la emisión inherente al soporte y a las células sin teñir. Finalmente, el valor de fluorescencia se normalizó con respecto al número de células de los cultivos en todos los tiempos en los que se procedió a la medida.

RESULTADOS

1. Fisiología del fenómeno de represión catabólica en *Sphingopyxis macrogolittabida* TFA

1.1. Crecimiento de TFA en diferentes fuentes de carbono e inducción de los genes *thn*

Como se ha descrito en la introducción de esta Tesis, el fenómeno de represión catabólica en *S. macrogolittabida* TFA había sido descrito y parcialmente caracterizado con anterioridad (Martínez-Pérez *et al.*, 2004). No obstante, algunos aspectos del estado fisiológico de TFA en condiciones de represión catabólica de los genes *thn* que no habían sido analizados en detalle se han estudiado en el desarrollo de esta Tesis y se muestran en este apartado.

En primer lugar, se investigó si el fenómeno de represión catabólica observado a nivel de expresión de los genes *thn* (Martínez-Pérez *et al.*, 2004) conllevaba un crecimiento diáuxico en *S. macrogolittabida* TFA, tal y como está descrito para muchas otras bacterias, como por ejemplo en *E. coli* en presencia de glucosa y lactosa (Moses *et al.*, 1966) o en la α -proteobacteria *Sinorhizobium meliloti* creciendo en un medio con succinato y lactosa (Bringhurst *et al.*, 2002). Un crecimiento de estas características permitiría identificar el momento temporal en el que se produce un cambio metabólico y fisiológico debido a la disminución en el medio de la disponibilidad de la fuente de carbono preferencial, y esto, a su vez, podría facilitar el estudio de las señales intracelulares que conllevan ese cambio. Así mismo, la presencia de un crecimiento diáuxico podría representar una herramienta útil para el estudio del fenotipo de mutantes de *S. macrogolittabida* TFA potencialmente implicados en represión catabólica.

Para el estudio del crecimiento diáuxico se emplearon cultivos de la estirpe TFA-1002 de *S. macrogolittabida* TFA, que porta una fusión traduccional del gen *thnC* al gen *lacZ* en el cromosoma para poder cuantificar la expresión de los genes *thn* durante el crecimiento. Para los ensayos, se cultivó esta estirpe en medio mínimo (MM) suplementado con tetralina y β -HB en dos concentraciones diferentes, 20 y 40 mM, que representan condiciones de represión catabólica de menor o mayor intensidad, respectivamente. Los cultivos se iniciaron a una D.O.₆₀₀ de 0,1 a partir de un cultivo previo en MM con β -HB 40 mM y crecido hasta fase exponencial (D.O.₆₀₀ de 0,8, aproximadamente). Durante todo el seguimiento del crecimiento, se recogieron alícuotas de los cultivos para medir inducción

de los genes *thn* (a la que se llamará “inducción *thn*” a lo largo de esta memoria) mediante ensayo β -galactosidasa. Además, se tomaron muestras en algunos puntos para hacer conteo de células viables en placas de medio rico (MML). Como control, se midió también el crecimiento de TFA-1002 y la expresión de la fusión *thnC::lacZ* en medio mínimo solo con tetralina o con β -HB 20 ó 40 mM. Los resultados obtenidos en las condiciones de represión catabólica hasta un total de 100 horas se muestran en las figuras 17A-B. En la gráfica C de la misma figura se representan los resultados obtenidos con las fuentes de carbono suministradas individualmente y en los tiempos más cortos (de 0 a 40 horas).

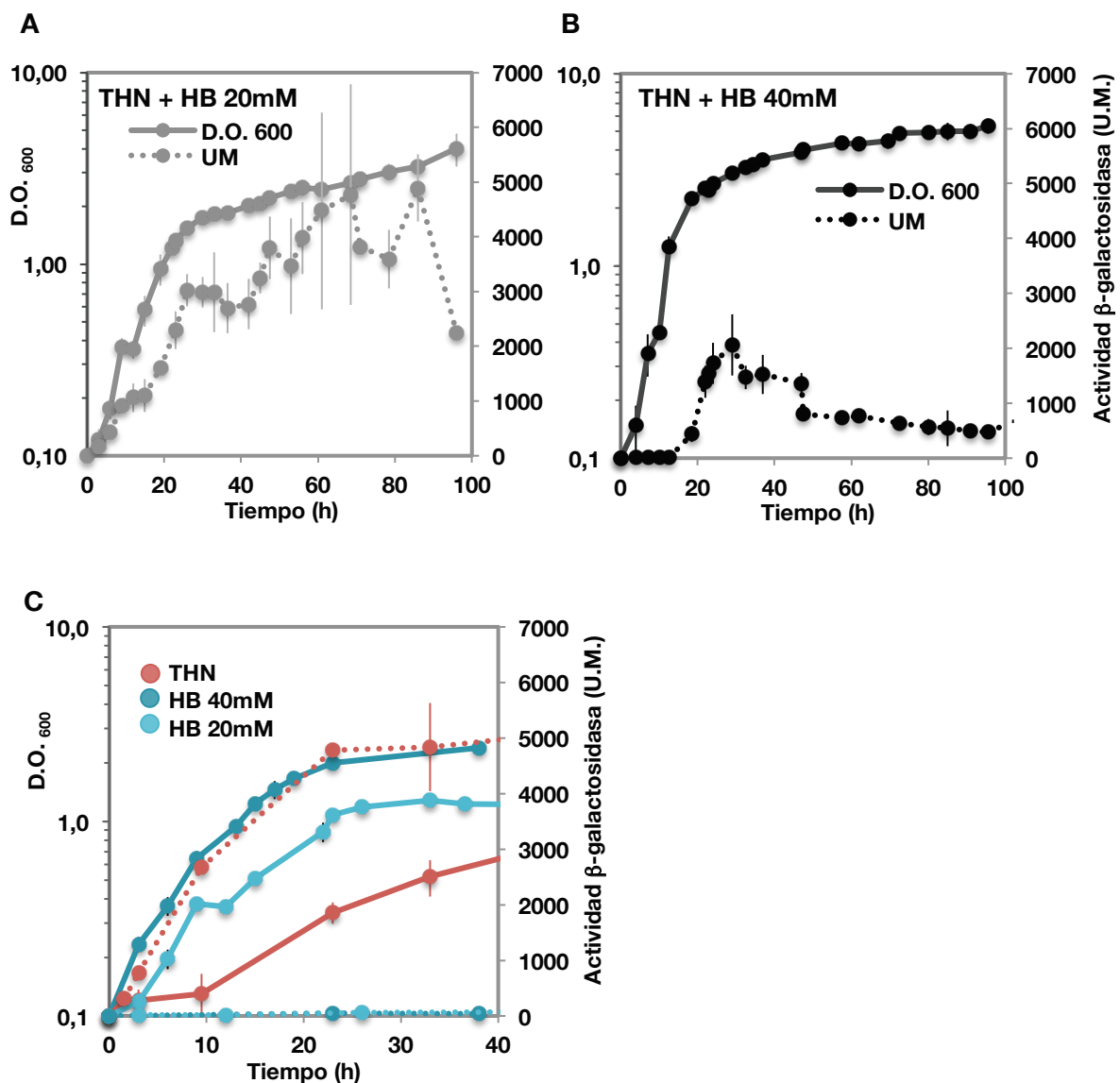


FIG. 17. Curvas de crecimiento de TFA-1002 e inducción de la fusión *thnC::lacZ* en MM + tetralina + β -HB 20 mM (A), MM + tetralina + β -HB 40 mM (B) o en las fuentes de carbono por separado (C). Las curvas se iniciaron en todos los casos a partir de pre-cultivos en MM + β -HB 40 mM. En línea continua se representa el

crecimiento en unidades de D.O.₆₀₀ y en línea discontinua el nivel de expresión de la fusión *thnC::lacZ* en Unidades Miller. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura 17, *S. macrogolitabida* TFA no presenta un crecimiento diáuxico en presencia de tetralina y una u otra concentración de β -HB, no siendo posible distinguir dos fases de crecimiento con tasas de crecimiento distintas y separadas por una fase de latencia.

Durante el crecimiento en tetralina+ β -HB 40 mM (Fig. 17B), la inducción de los genes *thn* comenzó entre las 15-20 h, en una fase de crecimiento en la que la bacteria debe estar haciendo uso exclusivo del β -HB como fuente de carbono y energía, ya que el tiempo de generación calculado en el intervalo 0-20 horas ($4\pm 0,5$ h) coincide con aquel que los mismos cultivos presentan en presencia de β -HB 40 mM como única fuente de carbono. Por otro lado, la inducción de la fusión *thnC::lacZ* no llegó en ningún momento a los niveles máximos característicos que se obtienen durante el crecimiento de TFA a expensas de tetralina (5000 UM, Fig. 17C). La bajada en el nivel de UM, que puede observarse en la gráfica 17B y que se produjo tras el pico más alto de expresión, no fue una disminución real, sino una estabilización de la expresión génica. Debido a que el cálculo de las UM está en todo momento referido a la D.O.₆₀₀, el valor disminuye si el nivel absoluto de actividad se mantiene constante pero la medida de crecimiento se incrementa. El conteo de viables en placa determinó que el crecimiento bacteriano registrado mediante la medida de D.O.₆₀₀ no es real por encima del valor de 2 (alcanzado aproximadamente a las 18h), momento en el cual el cultivo alcanza un máximo de 10^{10} ufc/ml y deja de aumentar.

Con respecto al crecimiento en tetralina+ β -HB 20mM (Fig. 17A) puede observarse que, en este caso, la inducción de la fusión *thnC::lacZ* se adelantó en el tiempo, comenzando a apreciarse a las 3 h y alcanzando niveles mucho más altos (casi las 5000 UM características del crecimiento en tetralina) al cabo de unas 60 horas. El tiempo de generación calculado (aproximadamente 7 h) durante la fase exponencial de crecimiento en estas condiciones, coincidió con el tiempo de generación calculado durante el crecimiento en β -HB 20 mM solo, por lo que parece improbable que el cultivo bacteriano estuviera haciendo un uso real de la tetralina como fuente de carbono durante las primeras horas. El conteo de células viables en placa reflejó una ausencia de crecimiento real por encima de las 1,7 unidades de D.O.₆₀₀ (alcanzadas nuevamente las 10^{10} ufc/ ml a las 30 horas). Desde ese momento del crecimiento en adelante, se apreciaron unos niveles bastante elevados de

expresión de la fusión *thnC::lacZ*, aunque se registró también una gran variabilidad. Los conteos de viables realizados en presencia de tetralina o β -HB 20 mM por separado, revelaron que en ambas situaciones los cultivos alcanzan la concentración máxima de 10^{10} ufc/ ml, aunque el cultivo crecido con tetralina como única fuente de carbono y energía necesitó 45 horas (al cabo de las cuales la D.O.₆₀₀ es de aproximadamente 0,8) para alcanzar este valor. Nuevamente, la concentración de 10^{10} ufc/ ml, parecía estar definiendo en todos los casos la fase estacionaria de crecimiento.

Como puede observarse en las gráficas 17A y B, resulta llamativo que, a pesar de no existir un crecimiento neto real una vez alcanzada una D.O.₆₀₀ de 2 en tetralina+ β -HB 40 mM o de 1,7 en tetralina+ β -HB 20 mM, el aumento de D.O.₆₀₀ se mantiene hasta valores mucho mayores. Este incremento no se produce en presencia solo de β -HB (en una u otra concentración) como fuente de carbono (Fig. 17C).

Dada la fisiología de *S. macroglutabida* TFA que se desprende de las curvas de crecimiento e inducción de los genes *thn* en las condiciones de represión catabólica mediada por el ácido carboxílico β -hidroxibutirato, se quiso analizar si los resultados obtenidos serían similares en presencia de otro ácido carboxílico diferente.

Con ese objetivo, se analizaron las curvas de crecimiento e inducción siguiendo el mismo procedimiento y en la misma estirpe cambiando la fuente de carbono preferencial (β -HB) por ácido sebácico. La concentración empleada de este ácido graso (15,9 mM) se calculó para suministrar el mismo número de átomos de carbono que durante el uso de β -HB 40 mM. En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos en crecimiento e inducción durante 35 horas. En paralelo, se representan, a modo de referencia, las curvas de inducción y crecimiento de la estirpe TFA-1002 en MM suplementado con tetralina o con tetralina y β -HB 40 mM

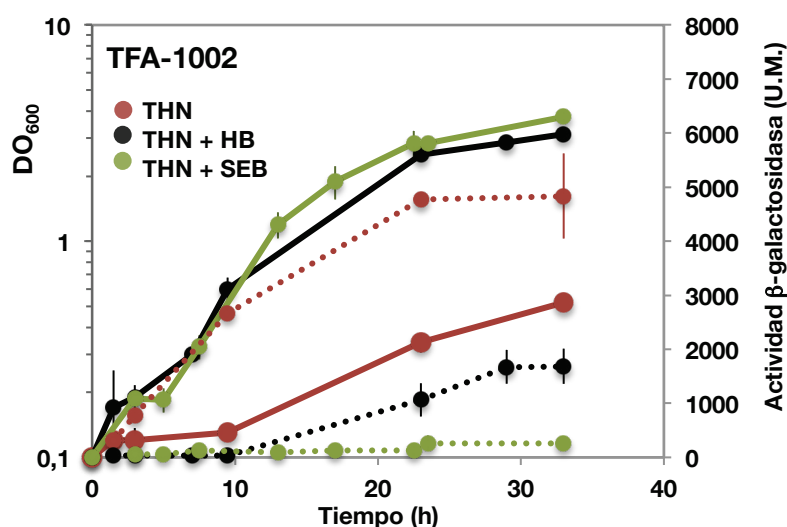


FIG. 18. Curvas de crecimiento de TFA-1002 e inducción de la fusión *thnC::lacZ* en MM + tetralina (rojo), tetralina + HB 40mM (negro) o tetralina + ácido sebácico 15,9mM (verde). Estos medios fueron inoculados con pre-cultivos de TFA en MM + HB 40mM (para los cultivos en tetralina o tetralina + HB 40mM) o MM + Sebácico 15,9mM (para los cultivos en tetralina + Sebácico 15,9 mM). En línea continua se representa el crecimiento en unidades de D.O.₆₀₀ y en línea discontinua, el nivel de expresión *thn* en U.M. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes.

Como puede observarse en la figura 18, el ácido sebácico resultó tener una capacidad represora mucho mayor sobre la inducción de los genes *thn* en comparación al β -HB. Nuevamente, el crecimiento del cultivo bacteriano al simultanear tetralina y ácido sebácico en el medio tampoco presentó la curva de diauxia esperada.

1.2. Crecimiento de MPO209 en diferentes fuentes de carbono e inducción de los genes *thn*

La disponibilidad en el laboratorio de la estirpe MPO209-1002 (afectada en la acumulación de PHB y con la misma fusión *thnC::lacZ* integrada en el cromosoma) permitió analizar su fenotipo de inducción de los genes *thn* en las mismas condiciones ya testadas anteriormente para TFA silvestre. Se pretendía comprobar si la desrepresión parcial de los genes *thn* en esta estirpe provocaría una disminución en el tiempo de generación creciendo en condiciones de represión catabólica al poder estar usando las dos fuentes de carbono simultáneamente.

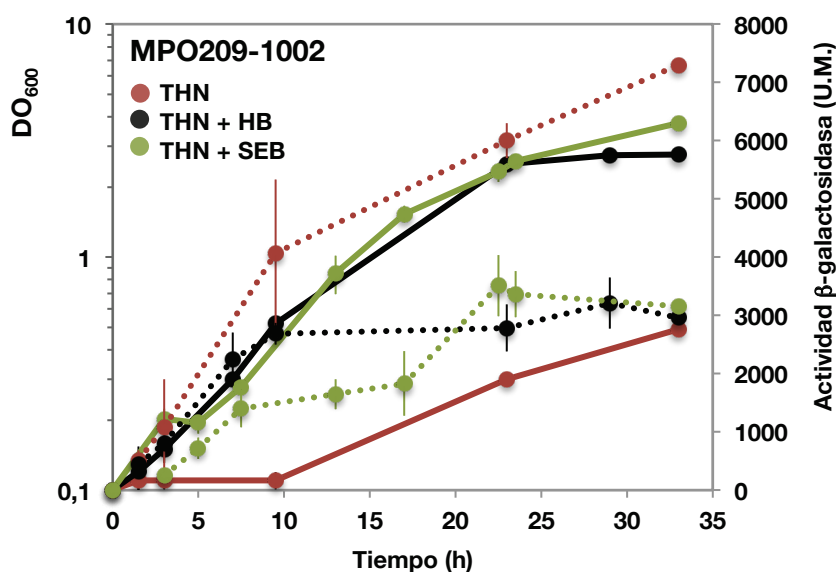


FIG. 19. Curvas de crecimiento de MPO209-1002 e inducción de la fusión *thnC::lacZ* en MM + tetralina (rojo), tetralina + HB 40mM (negro) o tetralina + ácido sebácico 15,9mM (verde). Estos medios fueron inoculados con pre- cultivos de MPO209-1002 en MM + HB 40mM (para los cultivos en tetralina o tetralina + HB 40mM) o MM + Sebácico 15,9mM (para los cultivos en tetralina + Sebácico 15,9 mM). En línea continua se representa el crecimiento en unidades de D.O.₆₀₀; en línea discontinua, el nivel de expresión *thn* en U.M. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes.

Como puede observarse en la figura 19, la inducción de los genes *thn* en la estirpe MPO209-1002 ocurrió de manera mucho más temprana en esta estirpe en las condiciones de represión catabólica (MM suplementado con tetralina y β -HB 40 mM o ácido sebácico 15,9 mM), manteniéndose una mayor represión en el caso del ácido sebácico. El nivel de inducción en presencia de tetralina como única fuente de carbono fue mayor en comparación con las demás condiciones de crecimiento. Como cabía esperar, tampoco se apreció un crecimiento diáuxico en esta estirpe. Con respecto al tiempo de generación, no se produjo ninguna reducción en comparación con el de TFA silvestre, obteniéndose unos valores de $4 \pm 0,5$ h para el crecimiento en tetralina con β -HB 40 mM o con ácido sebácico 15,9 mM.

1.3. Análisis de la represión catabólica a nivel transcripcional

Las curvas de expresión *thn* descritas en el apartado anterior generaron información sobre la capacidad de inducción de los genes de degradación de tetralina al transferir los cultivos de *S. macroglutabida* TFA de una condición de no inducción (MM con β -HB 40mM) a un medio en presencia del inductor tetralina y otra fuente preferente de carbono. Sin embargo, no ofrecen ninguna información sobre la represión de los mismos genes en condiciones de cultivo en las que es esperable el “apagado” de la expresión de los genes *thn*. Es decir, alterando las condiciones de inducción *thn* (medio en presencia de tetralina como única fuente de carbono) hacia otras que promuevan el fenómeno de represión catabólica (por adición de la fuente de carbono preferencial al mismo medio).

Se decidió analizar el patrón de “apagado” de expresión de los genes *thn* al aplicar el estímulo de represión catabólica (adición de β -HB 40 mM) a cultivos tanto de TFA silvestre como del mutante MPO209 creciendo en condiciones de inducción *thn* (MM suplementado con tetralina como única fuente de carbono y energía). Se seleccionaron los genes *thnB* y *thnR* como genes diana para cuantificar su expresión mediante RT-qPCR. A un cultivo en fase exponencial del crecimiento en tetralina ($D.O_{600} = 0,7-0,8$; tiempo 0), se le añadió β -HB para que quedara a una concentración de 40 mM y se tomaron muestras a los 3, 6, 9, 60, 180 y 300 minutos. Como control, se analizó en paralelo la expresión de los mismos genes en TFA silvestre adicionando agua en lugar de β -HB al medio de cultivo. Los resultados se representan en la figura 20.

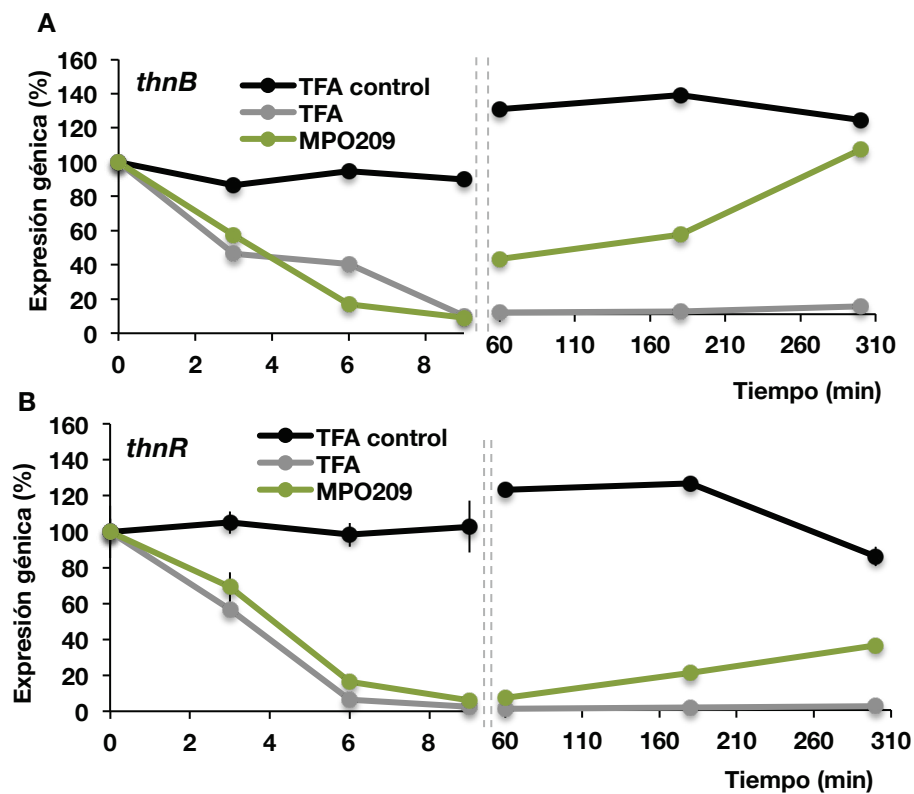


FIG. 20. Cuantificación de la expresión de los genes *thnB* (A) y *thnR* (B) mediante RT-qPCR en TFA y en el mutante MPO209. El cDNA de cada estirpe se obtuvo de un cultivo que había sido crecido en MM + tetralina hasta fase exponencial (tiempo 0) y tras 3, 6, 9, 60, 180 y 300 minutos de la adición de β -HB 40 mM. En el caso de la muestra control de TFA se adicionó agua en lugar de β -HB. El nivel de expresión está indicado como porcentaje del observado en el tiempo cero, justo antes del estímulo de represión catabólica. Se midieron 2 réplicas biológicas.

Como se aprecia en la figura 20, la respuesta en la expresión de los genes *thn* en los tiempos cortos fue similar para la estirpe MPO209 y TFA silvestre, ya que en ambos casos decae rápidamente. Sin embargo, la estirpe mutante (afectada en la acumulación de gránulo de PHB) comenzó a recuperar la inducción de los genes *thn* a partir de una hora. Cabe interpretar, por tanto, que el mutante MPO209 tiene un fenotipo diferenciable no a nivel de represión de los genes *thn*, sino en lo que atañe a su inducción, de tal forma que la expresión se recupera más rápidamente en condiciones de represión catabólica.

2. Caracterización a nivel proteómico del fenómeno de represión catabólica en *Sphingopyxis macrogolabida* TFA

Con el fin de analizar y comprender la respuesta fisiológica que las condiciones de represión catabólica generan en *S. macrogolabida* estirpe TFA, se realizaron dos estudios independientes a nivel proteómico basados en la resolución en geles bidimensionales del proteoma de la bacteria y su comparación en situaciones metabólicas distintas. Aunque no suele ser lo habitual, este tipo de aproximación podría facilitar la identificación de proteínas directamente implicadas en la regulación del proceso de represión catabólica gracias a su expresión diferencial en las condiciones de interés. Adicionalmente, el análisis *in silico* de las regiones circundantes al promotor génico de las proteínas expresadas diferencialmente e identificadas en cada condición, podría permitir la detección de secuencias reguladoras comunes en los promotores de los genes correspondientes.

2.1. Comparación de dos proteomas estáticos: condición de inducción de los genes *thn* vs. condición de represión catabólica

En primer lugar, se comparó el proteoma de cultivos independientes de *S. macrogolabida* TFA que habían crecido hasta fase exponencial (D.O.₆₀₀ de 0,8) en condiciones de inducción de los genes *thn* (medio mínimo suplementado con tetralina) o en condiciones de represión catabólica (medio mínimo suplementado con tetralina y β -HB 40mM).

Los extractos de proteínas procedentes de 4 réplicas biológicas independientes para cada condición fueron marcados con fluoróforos y sometidos a 2D-DIGE (Differential In Gel Electrophoresis) en 4 réplicas técnicas según está descrito en el apartado 4.2 de Materiales y Métodos. Se llevaron a cabo dos repeticiones del mismo experimento completo, variando únicamente el rango de punto isoeléctrico (3-7 ó 3-11) en el que el extracto de proteínas se resolvía en la primera dimensión. La fluorescencia de los geles bidimensionales se cuantificó y analizó con el software DeCyder. Se aplicó un filtro de selección de proteínas cuya intensidad fuera al menos dos veces mayor en una condición que en la otra, con una T-Student menor o igual a 0,01 y aplicando la corrección de la “Tasa de Descubrimientos Falsos” (FDR). También se llevó a cabo un análisis de componentes (figuras 1 y 2 del Anexo 1) para confirmar que las dos condiciones experimentales analizadas presentaban realmente una varianza significativa.

El número de proteínas detectadas en el 100% de los geles y el número de proteínas que presentaban, al menos, el doble de abundancia en una u otra condición se recogen en la tabla 6.

	2D-DIGE pI 3-7	2D-DIGE pI 3-11
Nº proteínas totales	1511	1950
Nº proteínas inducidas en THN+HB	127	211
Nº proteínas inducidas en THN	197	319

Tabla 6. Proteínas detectadas en los experimentos 2D-DIGE. En cada columna aparece el número de spots detectadas en cada rango de punto isoeléctrico utilizado y condición.

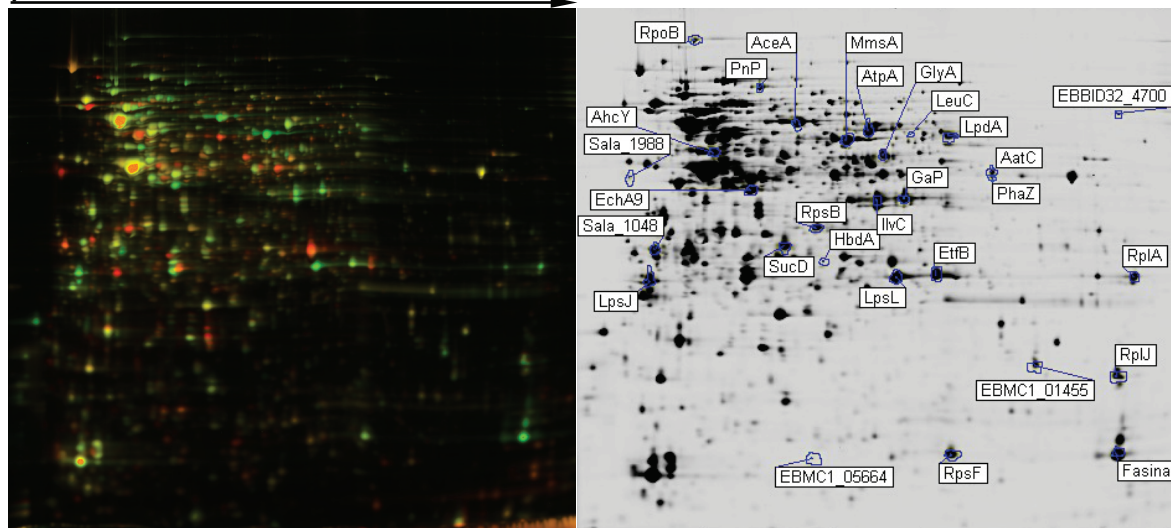
Tras el análisis, los geles se tiñeron con plata para la visualización y el aislamiento de las proteínas deseadas. Dado el especial interés en la condición de represión catabólica, la mayoría de proteínas aisladas de los geles e identificadas por espectrometría de masas fueron aquellas sobreexpresadas en esa condición. De las sobreexpresadas en condiciones de inducción solo se identificaron algunas proteínas con un alto nivel de cambio (mínimo de 3 veces) con respecto a las condiciones de represión y evitando incluir en el aislamiento aquellas que por su posición en el gel pudieran corresponder a las proteínas ya conocidas de la ruta de degradación de tetralina.

De las 50 proteínas aisladas de gel, 46 consiguieron identificarse con buen *e-value* empleando el software MASCOT y la anotación del genoma de *S. macrogolitabida* TFA. De entre las identificadas, 43 pertenecían a proteínas diferentes. En la figura 21 se muestran las imágenes obtenidas con el programa DeCyder tras el escaneo de los geles, así como las etiquetas de las proteínas identificadas (cuya información completa puede consultarse en la tablas 7 y 8). Las imágenes en color muestran las proteínas sobreexpresadas en la condición de represión catabólica (en verde), las sobreexpresadas en la condición de tetralina (en rojo) o las comunes para ambas condiciones (en amarillo). Las imágenes sin color corresponden a la visualización del mismo gel tras filtrar únicamente la fluorescencia emitida por cada una de las proteínas presentes en los extractos de la condición de represión catabólica (marcadas con un fluoróforo en concreto).

En las tablas 7 y 8 que siguen a la figura 21 se detalla la información de cada identificación ordenada según la categoría KEGG a la que pertenecen y las veces de inducción.

A

pl 3-11 NL



B

pl 3-7 NL

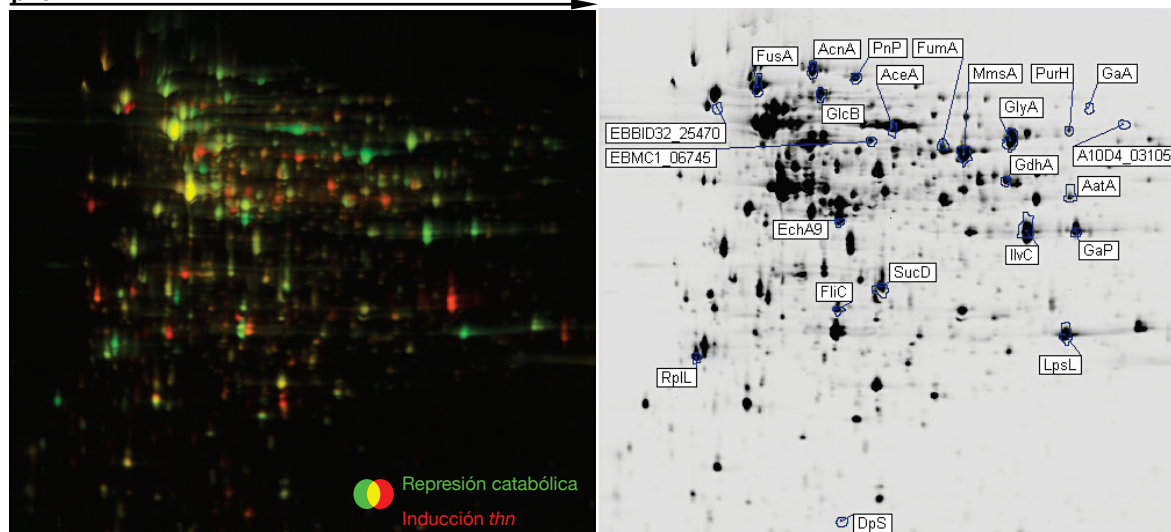


FIG. 21. Identificaciones de proteínas sobre las imágenes de los experimentos 2D-DIGE. Se muestran las imágenes de fluorescencia (donde las manchas verdes pertenecen a la condición de represión catabólica, las rojas a la de inducción *thn* y las amarillas a ambas) y la imagen del nivel de fluorescencia de cada spot de la condición de represión catabólica con su identificación. A. Primer experimento 2D-DIGE, donde se empleó un rango de pl entre 3 y 11. B. Segundo experimento 2D-DIGE, donde se empleó un rango de pl entre 3 y 7. Para cada experimento se realizaron 4 réplicas biológicas y 4 técnicas.

Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Veces de cambio de expresión	E.C.	Categoría
4092	<i>hbdA</i>	3- hidroxiaxil-CoA deshidrogenasa	29,0	5,64	8,27	1.1.1.35	Metab. ác. grasos y PHB
3403	<i>leuC</i>	3- isopropilmalato deshidratasa, subunidad mayor	50,4	6,2	5,41	4.2.1.33	Metab. proteínas y aminoácidos
2050	<i>gaa</i>	Éster hidrolasa de α-aminoácidos	71,9	6,09	4,07	3.1.1.43	Metab. proteínas y aminoácidos
3768	<i>EBMC1_05664</i>	Proteína transductora de señales con dominios CBS	15,3	5,62	14,17		Transporte y señalización
895	<i>Sala_1988</i>	OmpA/ MotB	35,4	4,48	7,80		Transporte y señalización
3945	<i>dps</i>	Proteína de la familia Ferritina Dps	18,7	5,84	4,46		Respuesta a estrés
2818	<i>thnM</i>	Proteína tipo receptor dependiente de TonB	79,4	4,97	6,43		Degrad. compuestos aromáticos
4196	<i>A10D4_03105</i>	Putativa proteína no caracterizada	66,4	6,4	3,20		No caracterizadas

Tabla 7. Identificación, mediante espectrometría de masas (MALDI-MS), de las proteínas inducidas por tetralina en TFA. Se recoge en la tabla el identificador del gen que codifica para cada proteína, el nombre del gen según la anotación del genoma de TFA, la descripción de la proteína, el peso molecular (PM) en kilodaltons (KDa), el punto isoeléctrico teórico (pI), las veces de cambio con respecto a la condición de represión catabólica, el código enzimático y la categoría asignada según la función prevista para esa proteína en KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

RESULTADOS

Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Veces de cambio de expresión	E.C.	Categoría
2098	<i>aceA</i>	Isocitrato liasa	59,5	5,54	9,13	4.1.3.1	C. Krebs y/o C. glioxilato
3478	<i>fumA</i>	Fumarato hidratasa	55,1	5,68	3,35	4.2.1.2	C. Krebs y/o C. glioxilato
946	<i>sucD</i>	Succinil-CoA ligasa (formadora de ADP), subunidad α	30,0	5,51	2,40	6.2.1.5	C. Krebs y/o C. glioxilato
2773	<i>glcB</i>	Malato sintasa G	75,5	5,19	2,40	2.3.3.9	C. Krebs y/o C. glioxilato
3535	<i>acnA</i>	Aconitato hidratasa 1	96,4	5,17	2,06	4.2.1.3	C. Krebs y/o C. glioxilato
2187	<i>gap</i>	Gliceraldehído- 3- fosfato deshidrogenasa	35,8	5,93	3,88	1.2.1.12	Entner- Duodoroff y/o gluconeogénesis
898	<i>phaZ</i>	Polihidroxialcanoato depolimerasa, intracelular	42,9	7	14,16	3.1.1.76	Metab. ác. grasos y PHB
1308		Fasina	25,5	9,85	10,54		Metab. ác. grasos y PHB
3399	<i>lpsI</i>	3-oxoácido CoA transferasa, sbunidad A	26,2	6,02	8,59	2.8.3.5	Metab. ác. grasos y PHB
3401	<i>lpsJ</i>	3-oxoácido CoA transferasa, sbunidad B	23,3	4,66	6,16	2.8.3.5	Metab. ác. grasos y PHB
4119	<i>echA9</i>	Enoil-CoA hidratasa/ isomerasa	37,8	5,29	4,32	4.2.1.17	Metab. ác. grasos y PHB
4124	<i>mmsA</i>	Metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa	53,2	5,62	17,60	1.2.1.27	Metab. proteínas y aminoácidos
3513	<i>ahcY</i>	Adenosilhomocisteinasa	50,8	5,06	5,16	3.3.1.1	Metab. proteínas y aminoácidos

Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Veces de cambio de expresión	E.C.	Categoría
2667	<i>ilvC</i>	Cetol-ácido reductoisomerasa	37,3	6,17	4,43	1.1.1.86	Metab. proteínas y aminoácidos
2010	<i>gdhA</i>	Glutamato deshidrogenasa	45,3	6,04	3,41	1.4.1.4	Metab. proteínas y aminoácidos
1310	<i>aatC</i>	Aminotransferasa	44,3	6,99	2,59		Metab. proteínas y aminoácidos
3472	<i>aatA</i>	Aminotransferasa	43,4	6,07	2,07		Metab. proteínas y aminoácidos
2465	<i>glyA</i>	Serina hidroximetiltransferasa	46,3	5,92	2,06	2.1.2.1	Metab. proteínas y aminoácidos
3431	<i>pnp</i>	Poliribonucleótido nucleotidiltransferasa	83,7	5,36	4,10	2.7.7.8	Metab. purinas y pirimidinas
3750	<i>purH</i>	Proteína bifuncional PurH de síntesis de purinas	55,3	5,35	2,20	2.1.2.3	Metab. purinas y pirimidinas
3813	<i>atpA</i>	ATP sintasa, subunidad α	54,5	5,9	2,11	3.6.3.14	Fosforilación oxidativa
1044	<i>EBMC1_06745</i>	Fosfodiesterasa tipo I/ Nucleótido pirofosfatasa	59,2	6,22	2,09	3.6.1.9	Metab. purinas y pirimidinas
4133	<i>fliC</i>	Dominio de Flagelina	31,0	5,3	3,31		Morfología celular y movilidad
1714	<i>EBMC1_01455</i>	Regulador transcripcional de la familia CarD	19,9	6,77	4,70		Replicación y/o transcripción
3115	<i>rpoB</i>	ARN polimerasa (dependiente de ADN), subunidad β	154,2	4,99	2,30	2.7.7.6	Replicación y/o transcripción
3133	<i>rplA</i>	Proteína L1 subunidad 50S ribosomal	24,1	9,34	5,84		Traducción

Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Veces de cambio de expresión	E.C.	Categoría
2794	<i>rpsB</i>	Proteína S2 subunidad 30S ribosomal	29,6	5,45	2,90		Traducción
3123	<i>rplJ</i>	Proteína L10 subunidad 50S ribosomal	17,4	8,96	2,54		Traducción
1470	<i>rplI</i>	Proteína L9 subunidad 50S ribosomal	22,6	4,52	2,35		Traducción
1472	<i>rpsF</i>	Proteína S6 subunidad 30S ribosomal	13,9	6,32	2,28		Traducción
299	<i>fusA</i>	Factor de elongación G	76,3	4,92	2,07		Traducción
2326	<i>Sala_1048</i>	SapC	28,8	4,77	2,14		Transporte y señalización
950	<i>lpdA</i>	Dihidrolipoil deshidrogenasa	49,8	5,41	3,60	1.8.1.4	Otros
3467	<i>etfB</i>	Flavoproteína para transferencia de electrones, subunidad β	26,4	6,2	3,03		Otros
3491	<i>EBBID32_4700</i>	Proteína tipo Sel1 con repeticiones TPR	45,6	9,46	2,98		No caracterizadas

Tabla 8. Identificación, mediante espectrometría de masas (MALDI-MS), de proteínas inducidas en tetralina+ β -HB 40 mM en TFA. Se recoge en la tabla el identificador del gen que codifica para cada proteína, el nombre del gen según la anotación del genoma de TFA, la descripción de la proteína, el peso molecular (PM) en KDa, el punto isoelectrico teórico (pI), las veces de cambio con respecto a la condición de tetralina, el código enzimático y la categoría asignada según la función prevista para esa proteína en KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Tal y como aparece en la Tabla 8, cinco de las proteínas inducidas en las condiciones de represión catabólica son enzimas del ciclo de Krebs o de su variante del ciclo del glioxilato. Tanto el metabolismo del β -HB como el de la tetralina generan acetil-CoA en última instancia, por lo que su inducción podría deberse a que son necesarias en mayor cantidad debido a la mayor velocidad de crecimiento de TFA en β -HB en comparación con tetralina. El acetil-CoA es empleado en el ciclo de Krebs para la producción de elementos necesarios para el crecimiento de las células: poder reductor, ATP e intermediarios biosintéticos como el oxalacetato. La sobreexpresión de la isocitrato liasa indica que el isocitrato del ciclo de Krebs es dirigido a la producción de succinato y glioxilato (posteriormente empleado por la malato sintasa, también sobreexpresada, para la generación de malato) en vez de dar lugar a oxoglutarato.

Otra de las proteínas específicamente inducidas en la condición de represión catabólica es la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que participa en la ruta de Entner-Duodoroff y en la glucólisis para la producción de piruvato y, en sentido contrario, en las reacciones gluconeogénicas.

En cuanto al metabolismo de los ácidos grasos, tres enzimas implicadas en la degradación de los ácidos grasos y de los polímeros de PHB están inducidas en las condiciones de represión catabólica: la polihidroxibutirato depolimerasa y la 3-oxoácido-CoA-transferasa (implicadas en la despolimerización de los gránulos de PHB y en la conversión del β -HB hasta acetoacetil-CoA, respectivamente) y la enoil-CoA hidratasa, responsable del paso de hidratación en la ruta de degradación de ácidos grasos. También se identificó una fasina sobreexpresada en las mismas condiciones metabólicas. Las fasinas son parte mayoritaria de la envuelta que recubre los gránulos de reserva, compuesta también por PHA-sintasas, PHA-depolimerasas y otras proteínas. Está descrito que las fasinas se sintetizan mayoritariamente bajo condiciones que permiten la acumulación de PHA, llegando a representar en algunos casos hasta el 5% de la proteína total (Wieczorek *et al.*, 1995), y que influyen en la tasa de síntesis y en las dimensiones de los gránulos de reserva (Potter *et al.*, 2005).

De entre las proteínas inducidas en condiciones de represión catabólica que tienen que ver con el metabolismo de los aminoácidos, hay que destacar la presencia de 2 aminotransferasas (codificadas por genes distintos), de una glutamato deshidrogenasa y de una metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa, ya que catalizan reacciones de

importancia para la conexión del metabolismo de los aminoácidos con el metabolismo del carbono. También aumenta la expresión de una serina hidroximetiltransferasa, una adenosilhomocisteinasa y una cetol-ácido reductoisomerasa, implicadas en la síntesis de glicina, serina y treonina, cisteína y metionina y de valina y leucina, respectivamente.

En las condiciones de represión catabólica, que implican una mayor disponibilidad de carbono, se ve además incrementada la expresión de algunas proteínas que son un reflejo directo de la mayor velocidad de crecimiento de la bacteria en estas condiciones. Es el caso de varias proteínas ribosómicas (proteínas S2 y S6 de la subunidad 30S y proteínas L1 y L10 de la subunidad 50S) y del factor de elongación G. La expresión de la subunidad β de la ARN polimerasa también está incrementada, sugiriendo que una mayor actividad de los procesos de transcripción está teniendo lugar.

En cuanto a los procesos de transporte y señalización, la proteína SapC, constituyente de un transportador implicado en virulencia y en resistencia a antibióticos en *Salmonella typhimurium* (Parra-Lopez *et al.*, 1993) y en *Haemophilus ducreyi* (Rinker *et al.*, 2012), está más expresada en las condiciones de represión catabólica.

Finalmente, cabe destacar la identificación del regulador transcripcional CarD, con identificador EBMC1_01455, que se encuentra inducido 4,7 veces en las condiciones de represión catabólica. La proteína anotada como CarD en *S. macroglutabida* es realmente homóloga al regulador CdnL (de la familia CarD), que es una proteína implicada en la regulación de diversos procesos en micobacterias, entre los que se encuentran el control de la respuesta estricta, la integridad génica y la supervivencia celular (Stallings *et al.*, 2011). Estas funciones son llevadas a cabo gracias a la capacidad de CdnL de interactuar con la subunidad β de la ARN polimerasa y modular la expresión de numerosos genes.

En las condiciones de crecimiento en tetralina, se detectó una mayor abundancia de la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enzima implicada en la degradación de los ácidos grasos en la fase de oxidación. También, la de una 3-isopropil-malato deshidratasa (implicada en la biosíntesis de leucina) y de una hidrolasa de α -aminoácidos.

Por otro lado, la proteína tipo OmpA/MotB se expresa casi 8 veces más durante el mismo crecimiento en tetralina. Las proteínas OmpA de membrana externa están

implicadas en múltiples procesos en enterobacterias: funcionan como adhesinas, participan en la formación de biofilm y sirven de receptores para bacteriófagos (Smith *et al.*, 2007). Las proteínas MotB, por su parte, son parte del motor del flagelo en *E.coli* (Blair *et al.*, 1991). Está descrito que las proteínas OmpA y MotB comparten un dominio C-terminal común que puede estar implicado en la interacción con peptidoglicanos (De Mot *et al.*, 1994)

También hubo un aumento, con respecto a las condiciones de represión catabólica, de la proteína de la familia Ferritina Dps. En *E. coli*, las proteínas Dps (DNA-binding protein in starved cells) protegen al ADN del daño oxidativo (Jeong *et al.*, 2008).

Por último, la proteína transductora de señales con dominios CBS (EBMC1_05664), fue muy mayoritaria (14 veces más expresión) en las condiciones de inducción *thn*. Para los dominios CBS (“Cystathione β -Synthase”) está demostrada su capacidad de unión de ATP, AMP y S-adenosil-metionina, convirtiéndose en módulos sensores del estado energético (Scott *et al.*, 2004).

2.2. Estudio de la dinámica del proteoma tras el estímulo de represión catabólica

En esta aproximación experimental, se analizaron los cambios en el proteoma de *S. macroglutabida* TFA en tiempos muy cortos (5, 15 y 30 minutos) tras la aplicación del estímulo de represión catabólica (adición de β -hidroxibutirato a concentración final en el medio de 40 mM) a los cultivos que venían creciendo en condiciones de inducción de los genes *thn*. El análisis del proteoma a estos tiempos debería reflejar aquellos cambios que están más directamente relacionados con el estímulo de represión catabólica en sí, ya que sólo se detectan aquellas proteínas que se sintetizan *de novo* o que dejan de hacerlo en respuesta al estímulo. Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Michael Hecker.

Para este tipo de análisis se emplearon 3 réplicas biológicas de cultivos creciendo en medio mínimo con tetralina. Una vez alcanzada la fase exponencial en estos cultivos (D.O.₆₀₀ de 0,6), se adicionó β -HB 40mM y se incubaron durante 5, 15 ó 30 minutos más. Tras ese tiempo, se añadió ³⁵S-metionina (que se incorporaría sólo en las proteínas de

120

nueva síntesis a partir de ese momento) y se recogieron las muestras, tras otros 10 minutos de incubación, según se detalla en el apartado 4.3.1 de Materiales y Métodos. En paralelo a los cultivos a los que se aplicó el estímulo de represión catabólica, se emplearon otras 3 réplicas biológicas de referencia a las que no se añadió β -HB 40mM pero que fueron tratadas de manera idéntica en el resto de aspectos, sirviendo por tanto, como referencia de la evolución del proteoma en los mismos tiempos pero en las condiciones de crecimiento a expensas únicamente de tetralina. De igual forma, se emplearon muestras de la situación de referencia inicial (cultivos crecidos en MM con tetralina hasta D.O.₆₀₀ de 0,6) como tiempo cero.

Los extractos radiactivos de proteínas del total de muestras (3 para cada una de las 3 réplicas biológicas de cada condición, más las 3 muestras del tiempo cero) se resolvieron en 21 geles bidimensionales utilizando un gradiente de pI lineal de 4 a 7 en la primera dimensión y geles SDS-PAGE al 13% de acrilamida. El secado y la obtención de imágenes correspondientes a las proteínas de nueva síntesis se desarrolló tal y como se describe en los Materiales y Métodos (apartados 4.3.4- 4.3.6).

El análisis de las imágenes radiactivas se llevó a cabo con el software Decodon Delta 2D, que consiguió establecer la presencia de 590 proteínas (13,7% del proteoma) en todos los geles analizados. Para la selección de proteínas de interés que serían posteriormente identificadas se comparó el nivel de intensidad de cada mancha del gel en las 2 condiciones metabólicas (inducción *thn* o represión catabólica) y en cada tiempo (5, 15 o 30 minutos) para todas las réplicas biológicas. Se seleccionaron aquellas cuya expresión en represión catabólica era de al menos el doble (relación ≥ 2 al dividir el nivel de expresión en represión catabólica con respecto a la condición de referencia en tetralina) o como mucho la mitad (relación ≤ 0.5 al dividir el nivel de expresión en represión catabólica con respecto a la condición de referencia en tetralina). Bajo este criterio, el programa Decodon Delta 2D calculó, para cada tiempo, el número de proteínas que aumentaban o reducían su abundancia tras el estímulo de represión catabólica que se indica en la tabla 9.

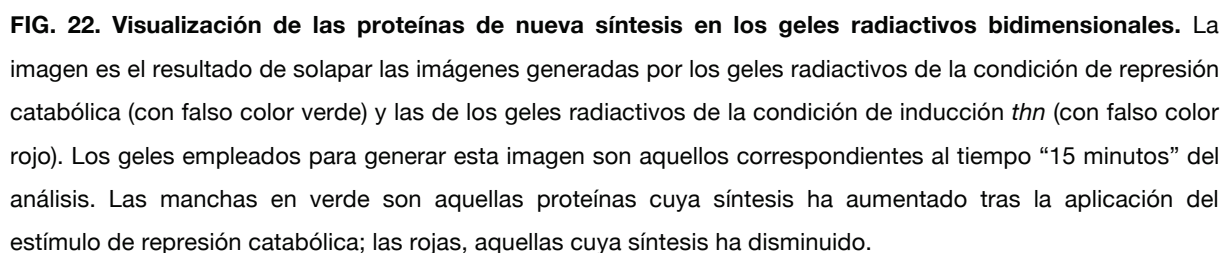
	Tiempo (min)		
	5	15	30
Aumento de abundancia	88	166	149
Reducción de abundancia	99	110	128

Tabla 9. Proteínas, inducidas o reprimidas, detectadas a lo largo del tiempo tras el estímulo de represión catabólica en los experimentos de proteómica radiactiva. Se indica en la tabla el número de proteínas cuya intensidad aumentó al menos el doble (ratio ≥ 2) o disminuyó al menos la mitad (ratio ≤ 0.5) a los 5, 15 o 30 minutos de la adición de β -HB 40mM a los cultivos creciendo en tetralina. Las proteínas detectadas en cada tiempo podían o no corresponder a las mismas proteínas ya detectadas en los otros tiempos. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para la selección de proteínas cuyas diferencias de abundancia fueran significativas entre una y otra condición.

De entre todas las proteínas seleccionadas, sólo 201 pudieron aislarse manualmente de los geles preparativos. De esos, 136 consiguieron identificarse correctamente mediante espectrometría de masas con buen *e-value* empleando el software MASCOT y la anotación del genoma de *S. macroglotabida* TFA. Finalmente, sólo 97 fueron identificaciones únicas, no repetidas.

En la figura 22 se muestra, como ejemplo, la imagen obtenida en Decodon Delta2D tras dar un falso color a las proteínas radiactivas presentes en cada condición en el tiempo 15 minutos. En verde se muestran las proteínas de nueva síntesis en las condiciones de represión catabólica y en rojo aquellas que se sintetizan durante la condición de crecimiento en tetralina pero que han dejado de hacerlo tras la adición de β -hidroxibutirato al medio de cultivo. En amarillo se visualizan aquellas proteínas que sintetizan en ambas condiciones. Se han añadido las etiquetas de las identificaciones de proteínas cuya información detallada puede consultarse en las tablas 10 y 11.

En las tablas 10 y 11 presentadas a continuación se detalla la información de cada identificación. Estas han sido organizadas en dos grupos: las proteínas que dejaron de sintetizarse (tabla 10) y las que empezaron a sintetizarse (tabla 11) tras el estímulo de represión catabólica. A su vez, las identificaciones se han ordenado por grupo funcional y veces de inducción en cada tabla para facilitar su interpretación.



Tiempo (min)	Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Relación expresión T+HB/ T	E.C	Categoría
5	2829	<i>thnD</i>	ácido 4-(2-oxociclohexil)-2-hidroxi-buta-2,4-dienoico hidrolasa	32,0	6,45	0,11		Degrad. compuestos aromáticos
5	2817	<i>thnN</i>	Proteína tipo glutaril-CoA deshidrogenasa	42,7	5,91	0,16		Degrad. compuestos aromáticos
5	255	<i>P450</i>	Citocromo P450	48,2	5,7	0,17	1.14.-.-	Degrad. compuestos aromáticos
5	2821	<i>thnJ</i>	Proteína tipo subunidad grande de pimeloil-CoA deshidrogenasa	43,9	5,53	0,21		Degrad. compuestos aromáticos
15	2822	<i>thnI</i>	Proteína tipo acetil-CoA acetil transferasa	41,7	5,16	0,21		Degrad. compuestos aromáticos
5	2831	<i>thnC</i>	1,2- dihidroxinaftaleno dioxigenasa	33,8	4,81	0,23		Degrad. compuestos aromáticos
5	2825	<i>thnA2</i>	Dioxigenasa hidroxilante de anillos, subunidad β	21,3	5,18	0,23		Degrad. compuestos aromáticos
5	2823	<i>thnH</i>	Proteína tipo CoA-transferasa	43,4	5,06	0,24		Degrad. compuestos aromáticos
5	2824	<i>thnG</i>	Aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD y no acilante	51,1	4,82	0,31		Degrad. compuestos aromáticos
5	2826	<i>thnA1</i>	Dioxigenasa hidroxilante de anillos, subunidad α	52,3	5,45	0,31		Degrad. compuestos aromáticos
30	2819	<i>thnL</i>	Proteína tipo enoil-CoA hidratasa/ 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	72,9	4,82	0,33		Degrad. compuestos aromáticos
5	2815	<i>thnP</i>	Proteína tipo subunidad α de flavoproteína para transferencia de electrones	31,4	4,35	0,33		Degrad. compuestos aromáticos
5	2818	<i>thnM</i>	Proteína tipo receptor dependiente de TonB	79,4	4,77	0,41		Degrad. compuestos aromáticos

RESULTADOS

Tiempo (min)	Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Relación expresión T+HB/ T	E.C	Categoría
30	2820	<i>thnK</i>	Proteína tipo subunidad pequeña de pimeloil-CoA deshidrogenasa	41,2	5,06	0,42		Degrad. compuestos aromáticos
5	1600	<i>AvCA6_42210</i>	Protocatecuato 4,5- dioxigenasa, subunidad β	28,8	4,98	0,50	1.13.11.8	Degrad. compuestos aromáticos
30	1976	<i>gltA</i>	Citrato sintasa	47,5	6,15	0,27	2.3.3.1	C. Krebs y/o C. glioxilato
5	2362	<i>korA</i>	Proteína tipo piruvato flavodoxina/ ferredoxina oxidorreductasa	65,9	5,18	0,42	1.2.7.3	C. Krebs y/o C. glioxilato
5	2814	<i>pyc</i>	Piruvato carboxilasa	125,4	5,06	0,48	6.4.1.1	C. Krebs y/o C. glioxilato
15	906	<i>atoB</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa	41,4	5,53	0,21	2.3.1.9	Metab. ác. grasos y PHB
5	3545	<i>Sala_0223</i>	Enoil-CoA hidratasa/ isomerasa	28,9	5,7	0,23	4.2.1.17	Metab. ác. grasos y PHB
5	2257	<i>EBMC1_16604</i>	Proteína tipo acil-CoA deshidrogenasa	44,5	5,03	0,25		Metab. ác. grasos y PHB
15	2489	<i>atoB</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa	40,5	6,35	0,30	2.3.1.9	Metab. ác. grasos y PHB
5	4109	<i>acd</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	48,6	6,46	0,32		Metab. ác. grasos y PHB
15	437	<i>fcs2</i>	Sintetasa y ligasa dependiente de AMP	55,7	4,57	0,38		Metab. ác. grasos y PHB
5	4115	<i>fadN</i>	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	72,7	5,95	0,46	1.1.1.35	Metab. ác. grasos y PHB
5	3728	<i>fabH</i>	3-oxoacil-(ACP) sintasa III	40,6	5,89	0,46	2.3.1.180	Metab. ác. grasos y PHB

Tiempo (min)	Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Relación expresión T+HB/ T	E.C	Categoría
5	2351	<i>acd</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	64,5	4,92	0,51		Metab. ác. grasos y PHB
5	3522	<i>EBMC1_05769</i>	Peptidil-dipeptidasa	67,9	5,88	0,30	3.4.15.5	Metab. proteínas y aminoácidos
15	719	<i>ABI_42180</i>	Peptidasa M20	45,8	5,46	0,35		Metab. proteínas y aminoácidos
5	3126	<i>EBMC1_14208</i>	Cisteín proteasa predicha, tipo transglutaminasa	98,5	5,04	0,38		Metab. proteínas y aminoácidos
30	867	<i>folH</i>	Peptidasa M28	58,0	4,91	0,48		Metab. proteínas y aminoácidos
15	3195	<i>pepQ</i>	Putativa dipeptidasa dependiente de metal	43,9	5,86	0,50	3.4.13.9	Metab. proteínas y aminoácidos
5	2675	<i>metE</i>	Metionina sintasa	84,9	5,65	0,50	2.1.1.14	Metab. proteínas y aminoácidos
5	3950	<i>purK</i>	Fosforibosilaminoimidazol carboxilasa, subunidad ATPasa	38,1	6,04	0,40	4.1.1.21	Metab. purinas y pirimidinas
5	776	<i>EBBID32_17530</i>	Proteína TadG de ensamblaje del pilus Flp	72,1	7,41	0,43		Morfología celular y movilidad
5	1507	<i>ftsZ</i>	Proteína FtsZ de división celular	51,4	4,13	0,43		Morfología celular y movilidad
30	402	<i>EBMC1_05159</i>	Receptor dependiente de TonB	101,3	4,85	0,22		Transporte y señalización
30	3987	<i>C725_2386</i>	Receptor dependiente de TonB	105,9	4,52	0,22		Transporte y señalización
15	2517	<i>ABI_26520</i>	Dominio de secuencia señal de la ruta de translocación Tat twin-arginina	65,2	6,05	0,38		Transporte y señalización

RESULTADOS

Tiempo (min)	Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Relación expresión T+HB/ T	E.C	Categoría
5	895	<i>Sala_1988</i>	OmpA/MotB	38,7	4,4	0,50		Transporte y señalización
5	1027	<i>groS</i>	Chaperonina 10 kDa	10,4	4,54	0,26		Respuesta a estrés
15	3015	<i>surA</i>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa, tipo PpiC	48,1	4,61	0,35	5.2.1.8	Respuesta a estrés
5	1687	<i>katA</i>	Catalasa	58,5	6,68	0,40	1.11.1.6	Respuesta a estrés
5	3832	<i>telA</i>	Proteína de resistencia a aniones tóxicos	44,0	5,12	0,43		Respuesta a estrés
5	2071	<i>A1OC_01325</i>	Putativa peptidil prolil cis-trans isomerasa secretada, tipo ciclofilina	33,5	6,24	0,45		Respuesta a estrés
5	3594	<i>ahpC</i>	Peroxirredoxina	20,9	4,63	0,46	1.11.1.15	Respuesta a estrés
30	2131	<i>A2cp1_2801</i>	Proteína con repeticiones de β-hélices paralelas	42,3	4,31	0,15		Otros
5	1154	<i>BJ6T_68800</i>	N-acetiltransferasa relacionada con GCN5	19,0	5,06	0,28		Otros
5	3819	<i>EBMC1_03640</i>	Metiltransferasa tipo 11	36,3	7,91	0,31		Otros
5	3371	<i>wrbA</i>	NAD(P)H deshidrogenasa (quinona)	20,7	5,22	0,32	1.6.5.2	Otros
30	2322	<i>yncB</i>	Dominio de unión a zinc de la alcohol deshidrogenasa	36,3	4,84	0,35		Otros
5	4047	<i>yjcS</i>	Alkil sulfatasa	70,2	6,28	0,37		Otros

Tiempo (min)	Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Relación expresión T+HB/ T	E.C	Categoría
5	1995	<i>alkK</i>	Sintetasa y ligasa dependiente de AMP	59,1	5,66	0,39		Otros
5	2093	<i>cpsA1</i>	Amidohidrolasa	45,2	6,36	0,43		Otros
5	2125	<i>pntA</i>	NAD(P) transhidrogenasa, subunidad α	38,5	4,97	0,45	1.6.1.2	Otros
5	2363	<i>lipN</i>	Dominio de α/β hidrolasa-3	33,8	4,56	0,49		Otros
5	951	<i>hipO</i>	Amidohidrolasa	45,5	5,84	0,50		Otros
5	2987	<i>C725_1528</i>	Putativa proteína no caracterizada	23,0	4,5	0,40		No caracterizadas

Tabla 10. Identificación, mediante espectrometría de masas, de proteínas que “apagan” su expresión tras la adición de β -HB a cultivos de TFA creciendo en tetralina. Se recoge en la tabla el tiempo en el que la proteína mostró una expresión diferencial con respecto a la muestra con β -HB añadido, el identificador del gen que codifica para esa proteína, el nombre del gen según la anotación del genoma, la descripción de la proteína, el peso molecular (PM), el punto isoeléctrico teórico (pI), la relación de expresión (calculada como el cociente entre la cantidad producida de esa proteína en las condiciones de represión catabólica y la de las condiciones de inducción *thn*), el código enzimático y la categoría asignada según la función prevista para esa proteína en KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

RESULTADOS

Tiempo (min)	Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Relación expresión T+HB/ T	E.C	Categoría
5	946	<i>sucD</i>	Succinil-CoA ligasa (formadora de ADP), subunidad α	30,3	5,17	4,84	6.2.1.5	C. Krebs y/o C. glioxilato
5	945	<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa	40,2	9,29	4,23	1.1.1.37	C. Krebs y/o C. glioxilato
5	2098	<i>aceA</i>	Isocitrato liasa	58,9	5,5	2,91	4.1.3.1	C. Krebs y/o C. glioxilato
30	3735	<i>fumC</i>	Fumarato hidratasa clase II	49,7	5,85	2,54	4.2.1.2	C. Krebs y/o C. glioxilato
15	2189	<i>fda</i>	Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa	31,2	4,95	2,59	4.1.2.13	Entner- Duodoroff y gluconeogénesis
5	3401	<i>lpsJ</i>	3-oxoácido-CoA transferasa, subunidad B	23,7	4,36	7,91	2.8.3.5	Metab. ác. grasos y PHB
5	3399	<i>lpsI</i>	3-oxoácido-CoA transferasa, subunidad A	25,9	6,06	6,43	2.8.3.5	Metab. ác. grasos y PHB
5	708	<i>EBMC1_09724</i>	CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga	62,4	4,91	3,54	6.2.1.3	Metab. ác. grasos y PHB
15	4119	<i>echA9</i>	Enoil-CoA hidratasa/ isomerasa	37,6	5,14	2,39	4.2.1.17	Metab. ác. grasos y PHB
5	4124	<i>mmsA</i>	Metilmalonato semialdehído deshidrogenasa	53,0	5,91	38,78	1.2.1.27	Metab. proteínas y aminoácidos
5	2673	<i>leuA</i>	2-isopropilmalato sintasa	60,4	4,88	12,33	2.3.3.13	Metab. proteínas y aminoácidos
5	860	<i>asd</i>	Aspartato-semialdehído deshidrogenasa	37,0	4,92	5,14	1.2.1.11	Metab. proteínas y aminoácidos
5	3513	<i>ahcY</i>	Adenosilhomocisteinasa	50,4	4,83	4,02	3.3.1.1	Metab. proteínas y aminoácidos

Tiempo (min)	Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Relación expresión T+HB/ T	E.C	Categoría
30	2667	<i>ilvC</i>	Cetol-ácido reductoisomerasa	36,8	6,19	2,54	1.1.1.86	Metab. proteínas y aminoácidos
5	3010	<i>ndk</i>	Nucleósido difosfato quinasa	15,2	5,27	3,50	2.7.4.6	Metab. purinas y pirimidinas
5	3750	<i>purH</i>	Proteína bifuncional PurH de biosíntesis de purinas	57,3	5,59	2,85	2.1.2.3	Metab. purinas y pirimidinas
15	1345	<i>guaA</i>	GMP sintasa (glutamina- hidrolizante)	58,3	5,01	2,46	6.3.5.2	Metab. purinas y pirimidinas
15	3431	<i>pnp</i>	Poliribonucleótido nucleotidiltransferasa	83,5	5,1	2,39	2.7.7.8	Metab. purinas y pirimidinas
5	3813	<i>atpA</i>	ATP sintasa, subunidad α	54,9	6,04	2,88	3.6.3.14	Fosforilación oxidativa
15	3815	<i>atpD</i>	ATP sintasa, subunidad β	54,0	4,97	2,55	3.6.3.14	Fosforilación oxidativa
15	1842	<i>mreB</i>	Proteína MreB determinante de forma bacilo	20,7	5,22	2,24		Morfología celular y movilidad
5	3864	<i>dnaK</i>	Chaperona DnaK	68,4	4,48	2,61		Replicación y/o transcripción
5	2793	<i>tsf</i>	Factor de elongación Ts	31,6	4,5	3,90		Traducción
5	3076	<i>lysS</i>	Lisina-tRNA ligasa	60,5	6,17	2,76		Traducción
5	1856	<i>rplY</i>	Proteína L25 subunidad 50S ribosomal	22,7	5,01	2,51		Traducción
5	2618	<i>rpsA</i>	Proteína S1 subunidad 30S ribosomal	61,6	4,83	2,50		Traducción

RESULTADOS

Tiempo (min)	Locus	Gen	Proteína	PM (KDa)	pI	Relación expresión T+HB/ T	E.C	Categoría
5	300	<i>tuf</i>	Factor de elongación Tu	42,9	4,83	2,35		Traducción
15	2733	<i>alaS</i>	Alanina-tRNA ligasa	94,1	5,46	2,26	6.1.1.7	Traducción
15	2194	<i>efp</i>	Factor de elongación P	21,1	4,57	2,00		Traducción
15	3768	<i>EBMC1_05664</i>	Proteína transductora de señales con dominios CBS	15,3	5,75	3,24		Transporte y señalización
5	2688	<i>AMBAS45_07130</i>	Complejo de la membrana externa receptor de hierro	93,1	4,84	2,90		Transporte y señalización
5	1727	<i>gshB</i>	Glutación sintetasa	34,7	5,09	2,89	6.3.2.3	Respuesta a estrés
30	1364	<i>pdxH</i>	Piridoxina/ piridoxamina 5-fosfato oxidasa	24,0	8,49	5,75	1.4.3.5	Otros
30	3163	<i>rutE</i>	Putativa NADH deshidrogenasa/ NAD(P)H nitroreductasa	21,5	5,69	3,27		Otros
5	3692	<i>acsA</i>	Acetil-CoA sintetasa	71,4	5,47	2,71	6.2.1.1	Otros
5	1926	<i>lldD1_1</i>	Lactato 2-monooxigenasa	41,0	5,35	2,20	1.13.12.4	Otros
15	3487	<i>A33O_09144</i>	Putativa proteína citoplasmática	24,2	5,43	4,77		No caracterizadas

Tabla 11. Identificación, mediante espectrometría de masas, de proteínas sintetizadas de *novo* tras la adición de β -HB a un cultivo de TFA creciendo en tetralina. Se recoge en la tabla el tiempo transcurrido tras el estímulo en el que la proteína mostró una expresión diferencial, el identificador del gen que codifica para esa proteína, el nombre del gen según la anotación del genoma de TFA, la descripción de la proteína, el peso molecular (PM), el punto isoelectrico teórico (pI), la relación de expresión (calculado como el cociente entre producción de esa proteína en las condiciones de represión catabólica y condiciones de inducción *thn*), el código enzimático y la categoría asignada según la función prevista para esa proteína en KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Para la mayoría de las proteínas Thn (13 de las 21 codificadas por los operones *thn*) pudo detectarse un rápido “apagado” de su expresión a partir de los 5 minutos en presencia de β -HB 40mM, poniendo de manifiesto el efecto inmediato del fenómeno de represión catabólica. Junto a la expresión de estas enzimas disminuye también la de un citocromo P450. Aunque los citocromos P450 componen una extensa familia de enzimas involucradas en un amplio rango de funciones metabólicas, para algunas de ellas, como la CYP108D1 de *Novosphingobium aromaticivorans*, se ha demostrado una implicación directa en rutas de degradación de compuestos aromáticos ya que cataliza la hidroxilación de los mismos (Bell *et al.*, 2012)

Además de las enzimas Thn, en la situación de represión catabólica se produce una disminución evidente en la expresión de las enzimas implicadas en la degradación de proteínas y aminoácidos (Peptidasas M20 y M28, Cisteín proteasa, peptidil dipeptidasa, peptidasa dependiente de metal, etc) y en proteínas relacionadas con la respuesta a estrés: enzimas para el plegado de proteínas y ARN (Peptidil-prolil cis-trans isomerasa tipo PpiC ó tipo ciclofilina; Chaperonina 10kDa), catalasa, peroxirredoxina (para la producción de glutatión), proteína de resistencia a aniones tóxicos, etc.

En sentido opuesto, la expresión de enzimas para la biosíntesis de algunos aminoácidos se vio incrementada tras la adición de β -HB a cultivos de TFA creciendo en tetralina. Es el caso de la aspartato-semialdehído deshidrogenasa para la síntesis de lisina, la cetol-ácido reductoisomerasa para la síntesis de valina e isoleucina o de la 2-isopropilmalato sintasa para la síntesis de leucina. Al igual que en los experimentos 2D-DIGE, la expresión de la metilmalonato semialdehído deshidrogenasa (que conecta la degradación de valina con la producción de propionil CoA) aumentó casi 39 veces.

La biosíntesis de purinas también pareció regularse al alza tras el estímulo de represión catabólica, ya que se registró un aumento en la abundancia de enzimas como la proteína bifuncional PurH o la GMP sintasa.

En sintonía con lo observado en los experimentos 2D-DIGE, la expresión de varias enzimas del ciclo de Krebs (malato deshidrogenasa, succinil-CoA ligasa, fumarato hidratasa) o de su variante del glioxilato (isocitrato liasa) se incrementó en respuesta al β -hidroxibutirato, generando mayor cantidad de ATP, poder reductor e intermediarios biosintéticos. Como reflejo del metabolismo activo y la mayor velocidad de crecimiento que

debe establecerse en las condiciones de represión catabólica, se identificaron otras proteínas inducidas, como las dos subunidades de la ATP sintasa o numerosas proteínas implicadas en los procesos de traducción como aa-tRNA ligasas, factores de elongación y componentes proteicos de los ribosomas.

En cuanto al metabolismo de los ácidos grasos y los gránulos de PHB, tras el estímulo de represión catabólica, se inducen una CoA ligasa de ácidos grasos de cadena larga (que cataliza la activación de los ácidos grasos con CoA para su transporte y su degradación), las dos subunidades de una 3-oxoácido-CoA transferasa (implicada en la degradación del β -HB) y una enoil-CoA hidratasa (de la ruta de degradación de ácidos grasos). Sin embargo, se detecta una disminución de unas 4 veces en la expresión de otra enoil-CoA hidratasa (codificada por un gen distinto), una acil-CoA deshidrogenasa y una 3-hidroxiacil-CoA hidratasa (implicadas también en las etapas de oxidación de la degradación de ácidos grasos).

En cuanto al transporte, es llamativa la disminución en la expresión de 2 proteínas receptoras dependientes de TonB distintas tras el estímulo de represión catabólica. Los transportadores de membrana externa dependientes de TonB transportan sustratos de manera activa y con una gran afinidad, generalmente compuestos con hierro o cobalamina (Tang *et al.*, 2012), pero también carbohidratos, aminoácidos o ácidos orgánicos (Blanvillain *et al.*, 2007, He *et al.*, 2008).

Finalmente, la misma proteína transductora de señales con dominios CBS cuya expresión fue mayor en el proteoma de células creciendo en presencia única de tetralina en los experimentos 2D-DIGE, se detectó esta vez como inducida 3 veces más tras 15 minutos en presencia del estímulo de represión catabólica. Aunque desconocemos la causa de esta aparente contradicción, podría ser consecuencia de que el aislamiento de la proteína (realizado en una zona del gel preparativo de los ensayos radiactivos con poca población e intensidad de proteínas) haya sido incorrecto, identificándose la proteína Cbs en el lugar de aquella para la que se obtuvo la cuantificación.

3. Construcción de mutantes de *Sphingopyxis macrogolabida* TFA en posibles genes reguladores

A pesar de la dificultad que suele entrañar la identificación de reguladores en el tipo de experimentos proteómicos desarrollados, se consiguió detectar la expresión diferencial de dos proteínas que pudieran estar implicadas en detección de la señal o la regulación de la respuesta del proceso de represión catabólica.

Una de ellas, cuya expresión fue 4,7 veces mayor en las condiciones de represión catabólica, es similar al regulador transcripcional CdnL (Tabla 8. Identificador *EBMC1_01455*, de la familia CarD), una proteína implicada en la regulación de diversos procesos en micobacterias, entre los que se encuentran el control de la respuesta estricta, la integridad génica y la supervivencia celular (Stallings *et al.*, 2011) y que ejerce su función uniéndose a la subunidad β de la ARN polimerasa. La otra, cuya expresión fue 14 veces mayor en las condiciones de inducción *thn*, es similar a una proteína transductora de señales con dominios CBS (Tablas 8 y 11. Identificador, *EBMC1_05664*), que pueden constituir módulos sensores del estado energético de la célula (Scott *et al.*, 2004),

Debido a la diferencia de expresión y a la posible interacción con la ARN polimerasa, en el caso de CdnL, y al posible papel de sensor energético en el caso de la proteína con dominios CBS, se decidió construir mutantes en los genes de *S. macrogolabida* TFA codificantes de dichas proteínas con el objetivo de confirmar o descartar su posible papel en la regulación del proceso de represión catabólica.

3.1. Construcción de un mutante carente del regulador transcripcional CdnL

El regulador transcripcional CdnL, detectado en los experimentos de proteómica, es una proteína pequeña, de 176 residuos, y única en todo el proteoma de *S. macrogolabida*. Posee un dominio implicado en la interacción con la ARN polimerasa y perteneciente a la familia “CarD_TRCF” (Pfam 02559). El nombre de esta familia de dominios hace referencia al extremo amino terminal de la proteína CarD, identificada inicialmente en *Myxococcus xanthus* (Nicolas *et al.*, 1994) y presente también en otras bacterias (Elias-Arnanz *et al.*,

2010). Las proteínas CarD poseen dicho dominio amino terminal, capaz de interactuar con la ARN polimerasa y modular su actividad, y otro dominio carboxilo terminal de unión al ADN (que no define a esta familia). Los reguladores CdnL presentan una gran similitud con ese dominio de unión a la ARN polimerasa y de ahí su nombre de “CdnL” (de CarD Nter-Like) (Garcia-Moreno *et al.*, 2010).

Con lo que respecta a las proteínas CdnL, solo algunas de ellas han sido estudiadas en distintas bacterias, habiéndose conseguido inferir su función únicamente en el caso de una mixobacteria y de un par de micobacterias.

La proteína CdnL de la δ -proteobacteria *Myxococcus xanthus*, resulta vital para la supervivencia celular y sólo ha podido analizarse su función gracias a la construcción de mutantes condicionales que hacen uso de un promotor de la misma bacteria regulable por luz. En este mutante condicional de *M. xanthus* en el que no se induce la expresión de CdnL, se observa un crecimiento aberrante de las células que afecta, en último término, a la división celular. Por el contrario, la sobreexpresión de CdnL producida desde dos promotores de ARNr colocados en tándem no parece tener ninguna repercusión. Se ha confirmado además en esta bacteria, que la proteína CdnL es capaz de interactuar con la subunidad β de la ARN polimerasa (Garcia-Moreno *et al.*, 2010).

Dentro del género de las Micobacterias, en *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*, se ha confirmado la letalidad de los mutantes de delección del gen *carD* (así llamado en la bibliografía a pesar de su homología con la proteína tipo CdnL, y no con CarD). Los mutantes condicionales en dicho gen, demuestran que la proteína CdnL tiene un papel fundamental en el control de la respuesta estricta, desarrollando una función prácticamente idéntica a aquella de DksA. Ha quedado demostrado, además, que la proteína CdnL de estas micobacterias está involucrada en el control de la expresión de numerosos genes, habiéndose detectado cambios en la transcripción de cerca de 400 de ellos (Stallings *et al.*, 2009). Al igual que en el caso de *M. xanthus*, se ha confirmado la capacidad de interacción con la subunidad β de la ARN polimerasa y la repercusión de dicha interacción en las funciones de CdnL (Weiss *et al.*, 2012, Gulten *et al.*, 2013).

El alineamiento de la secuencia proteica de la proteína CdnL de *S. macroglotabida* (codificada por el gen 1714) con las correspondientes de *M. xanthus*, *M. tuberculosis* y *M.*

smegmatis utilizando el programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) revela un alto parecido a todas ellas (Figura 23).

```

Sm          MSANTLVFEVGDYVVYPKHGVGRVIELQKSEIAGMQLELYVLRFEKEKMTLRVPTNKAEG 60
Mt_O53568   -----MIFKVGDTVVYPHGAALVEAIE~TRTIKGEQKEYLV~LKVAQGD~LTVRVPAENAEY 55
Ms_A0R561   -----MIFKVGDTVVYPHGAALIEAIE~TRTIKGEQKEYLV~LKVAQGD~LTVRVPADNAEY 55
Mx_Q50887   ---MQTSFKTGDKAVYPGQGVGEVMGIEHTEVAGQRQSFYVLRILENGMRIMIPINKVGS 57
           *:*** .*** :*.. :  ::  : * : .  ***. :  : : * :.

Sm          VGMRLSSDKTLKEALQVLTTK-PKVKRTMWSRRAQEYEAKINSGDLVSI~AEVTRDLFRA 119
Mt_O53568   VGV~RDVVGQEGLDKVFQVL~RAP-HTEEP~TNWSRRYKANLEK~LASGDVNKVAE~VVDLWRR 114
Ms_A0R561   VGV~RDVVGQEGLDKVFQVL~RAP-HTEEP~TNWSRRYKANLEK~LASGDVNKVAE~VVDLWRR 114
Mx_Q50887   VGLREIISEEDVKQVYSILKEKDISVDST~TWNNRYREYMEKIKTGSVFEIAEVL~RDLYLL 117
           ***:. :. :. :. :.* . . * *.** :  *: :. :. :*** **:.

Sm          DDQPEQSYSERQIFEAAASSRLARELAAMESDEKTAQAKILQILNEHAPKYYVEKVG 176
Mt_O53568   DQERGLSAGEKRMLAKARQILV~GELALAE~STDDAKAETIL~DEVLAAS----- 162
Ms_A0R561   DQERGLSAGEKRMLAKARQILV~GELALAE~NTDDAKAETIL~DEVLAAS----- 162
Mx_Q50887   KGD~KDLSFG~ERKMLDTARSLLIKELSLAKDCSEDEIESDLKKIFNLA----- 164
           . :  * .*: :. : * . * **: . : . : : : :.

```

FIG. 23. Alineamiento de la proteína CdnL de *S. macrogolitabida* TFA (Sm) con las correspondientes de *M. tuberculosis* (Mt_O53568), *M. smegmatis* (Ms_A0R561) y *M. xanthus* (Mx_Q50887). Cada proteína se nombra con una abreviatura correspondiente a la especie seguida su código Uniprot. Se señala con asterisco los aminoácidos idénticos en todas las proteínas y con doble punto aquellas sustituciones conservativas. El código de colores indica: residuos pequeños e hidrofóbicos (rojo), ácidos (azul), básicos (morado), con grupos hidroxilo, sulfhidrilo, amino (verde).

En la tabla 12 se muestra el porcentaje de cobertura, identidad y similitud obtenido utilizando Blastp.

	Cobertura (%)	Identidad (%)	Similitud (%)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	89	37	55
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	89	36	55
<i>Myxococcus xanthus</i>	89	35	58

Tabla 12. Parecido de la proteína CdnL de *S. macrogolitabida* TFA a las correspondientes de *M. xanthus*, *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.

A pesar de la similitud encontrada entre las proteínas de función conocida, el regulador CdnL desempeña una función altamente específica en cada microorganismo, de manera que la complementación de los mutantes condicionales de *cdnL* en *M. xanthus* no es posible con CdnL homólogos de otras bacterias ni con el dominio amino terminal del propio CarD de *M. xanthus* (Garcia-Moreno *et al.*, 2010). Por ello, es posible que la función de esta proteína en TFA fuera distinta a la descrita para las otras bacterias.

Con la intención de desentrañar la función de CdnL en *S. macrogolitabida* TFA, se procedió a la construcción de un mutante de sustitución del gen completo por un gen de resistencia a kanamicina.

Para la obtención del mutante de delección se construyó el plásmido pMPO1125, basado en el plásmido suicida pEX18tc. Este plásmido porta el gen *sacB*, que genera en las células sensibilidad a sacarosa. En pEX18tc se clonaron 2 regiones pertenecientes a las secuencias aguas arriba y aguas abajo del gen *cdnL* (Fig. 24A) flanqueando una resistencia a kanamicina (Fig. 24B).

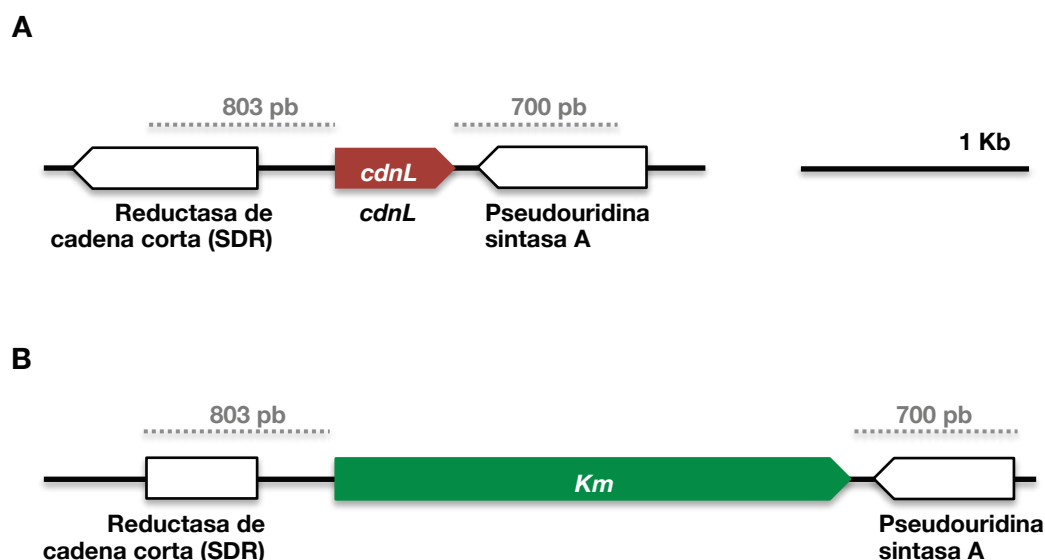


FIG. 24. Representación de *cdnL* en el cromosoma de TFA (A) y en la construcción del plásmido pMPO1125 (B). pMPO1125 (basado en el plásmido suicida pEX18tc) porta dos regiones de homología (indicadas en línea discontinua) con el cromosoma de TFA correspondientes a las secuencias de aguas arriba (803 pb) y aguas abajo (700 pb) de *cdnL* flanqueando un gen de resistencia a Km.

El plásmido pMPO1125 se introdujo en TFA por conjugación y se seleccionaron candidatos en medio rico con kanamicina y sacarosa con objeto de obtener aquellos que hubieran sufrido una doble recombinación. Aunque se repitió el experimento 5 veces no se obtuvo un transconjugante resistente a kanamicina y a sacarosa, mientras que fue perfectamente posible obtener transconjugantes resistentes a kanamicina y tetraciclina (resistencia del vector) pero sensibles a sacarosa, resultantes de un único evento de recombinación que mantendría aún una versión silvestre del gen en el cromosoma. La organización cromosómica de estos candidatos se comprobó por hibridación. En la figura 25A se muestra el patrón generado por los candidatos y TFA en la hibridación al emplear como sonda el gen de resistencia a kanamicina. Se esperaba, en este caso, una banda de 3,76 Kb para los mutantes (carriles 1-6) y ninguna para la muestra de TFA silvestre (wt).

En todos los casos, si dichos transconjugantes eran cultivados varios días en ausencia de sacarosa y de nuevo se hacía una búsqueda de colonias km^R y sac^R en placa, nunca se generaban los candidatos deseados con la delección en *cdnL*. En los casos en los que se obtenían algunas colonias sensibles a tetraciclina y resistentes a sacarosa (que debían haber perdido el plásmido gracias a un segundo evento de recombinación) el patrón de hibridación demostraba que se trataban de candidatos aberrantes con una organización genómica que no respondía a la deseada. En la figura 25B se muestra el nuevo patrón de hibridación generado por esos nuevos candidatos (provenientes de transconjugantes Km^R , Tc^R y Sac^R distintos) al emplear como sonda uno de los fragmentos flanqueantes del gen *cdnL*. Se esperaba una banda de 6,23 Kb para los candidatos o de 4,3 Kb para TFA con la restricción *Apal*; y una banda de 11,6 Kb para los candidatos o de 8,7 Kb para TFA con la restricción *Stul*.

Esta experiencia, sumada a lo recogido en la bibliografía, parecía indicar que el gen *cdnL* es esencial para la viabilidad de las células de *S. macrogolitabida*.

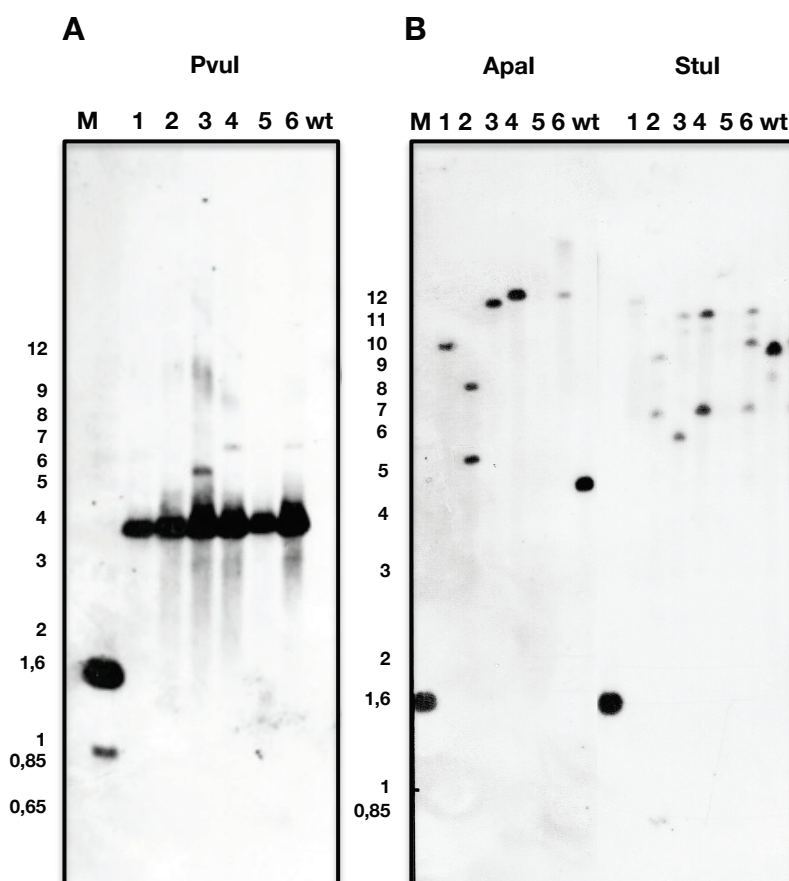


FIG. 25. Southern Blot de ADN cromosómico de los candidatos de TFA con la integración de pMPO1125 en el cromosoma (A) y de los candidatos Tc^S y sac^R (B). Los candidatos de cada caso están numerados del 1 al 6. En los geles se incluyó un marcador de tamaño (M) que también generó señal en sus bandas correspondientes a 1,6 y 1 Kb. En el lado izquierdo se especifican los tamaños de las bandas (en Kb)

Dada la imposibilidad de anular por completo la expresión del gen *cdnL*, se procedió a la construcción de mutantes condicionales mediante el uso de un promotor regulable por salicilato tal como se describe en el apartado 3.1.9 de “Materiales y Métodos” de esta tesis.

Siendo esta la primera vez que se intentaba la construcción de un mutante condicional en *S. macrogolitabida*, se comprobó, en primer lugar, la funcionalidad de todos los elementos que formarían parte de la expresión condicional del gen *cdnL*: el promotor *Psal* regulable por salicilato, el atenuador transcripcional *nasF* (añadido para disminuir la expresión basal) y el activador transcripcional NahR. La regulación de *Psal* por salicilato está mediada por NahR. En presencia del inductor, este activador induce la expresión desde el promotor *Psal* y refuerza también su propia expresión desde *Pnah*, consiguiéndose un aumento del efecto activador. Con el propósito de poner a prueba todo

el sistema, se midió mediante ensayo de actividad β -galactosidasa el nivel de expresión de un gen *lacZ* expresado desde *Psal* en construcciones idénticas a las que se emplearían para el caso de *cdnL*. Estas construcciones se expresaron en *trans* desde los plásmidos pMPO1129 y pMPO1140 (basados en el cósmido pLAFR3, de bajo número de copia - Friedman *et al.*, 1982, Staskawicz *et al.*, 1987- y replicativo en *S. macroglotabida* TFA) (Fig. 26).

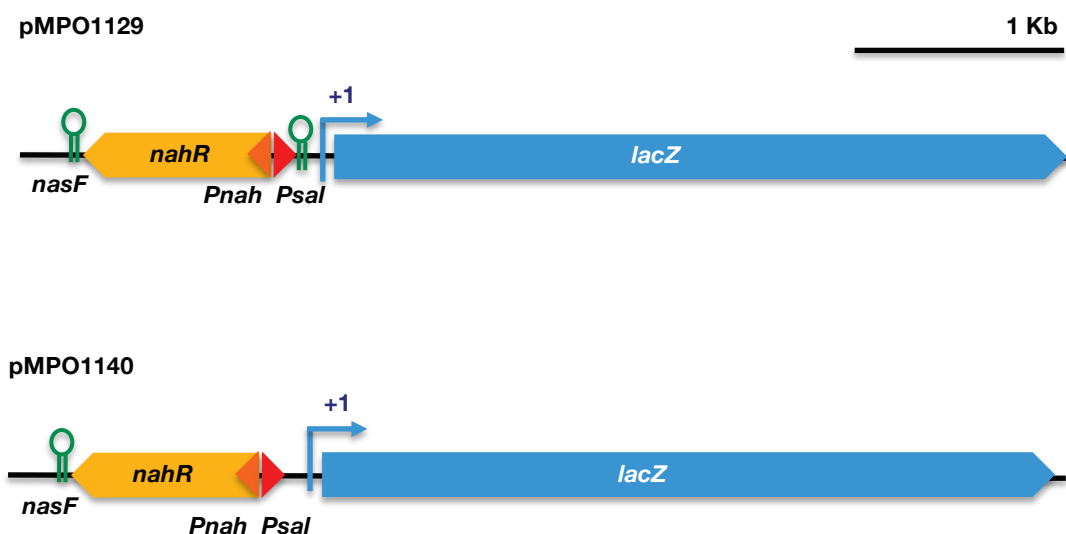


FIG. 26. Esquemas de los plásmidos pMPO1129 y pMPO1140 para testar la funcionalidad del promotor *Psal* en TFA. Ambos plásmidos (basados en pLAFR3) portan una o dos copias del atenuador de la transcripción *nasF*, el gen para el activador transcripcional *NahR* (que actúa sobre los promotores *Psal* y *Pnah* en presencia de salicilato) y el gen *lacZ* bajo el promotor *Psal*.

Estos plásmidos se introdujeron en TFA por conjugación y se ensayó la actividad β -galactosidasa en células crecidas hasta fase exponencial en medio mínimo con β -HB como fuente de carbono y energía y en presencia o ausencia de salicilato 2 mM. El resultado obtenido se muestra en la figura 27.

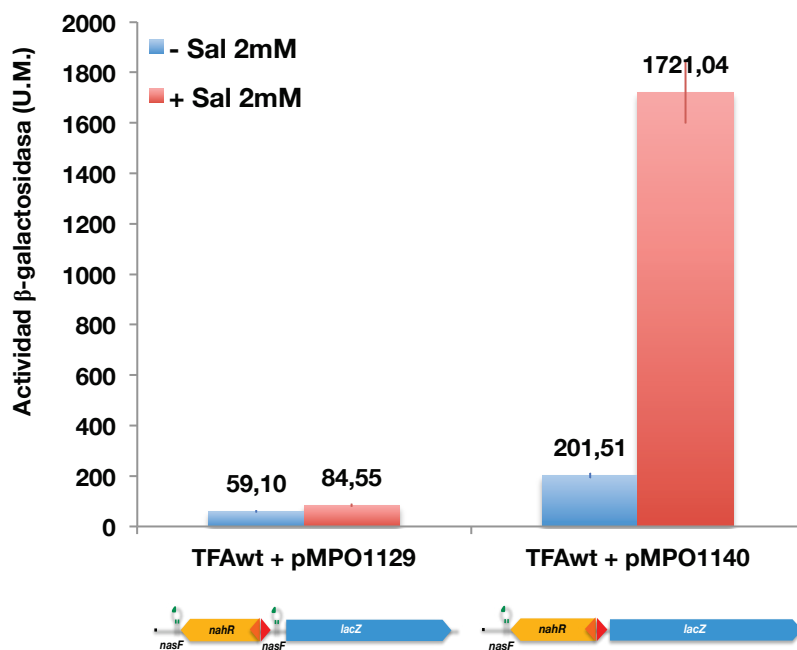


FIG. 27. Funcionamiento del promotor *Psal* en TFA. Se muestran los niveles de actividad β -galactosidasa al expresar el gen *lacZ* bajo *Psal* desde los plásmidos pMPO1129 o pMPO1140 en *trans* en *S. macroglutabida* TFA y en presencia o ausencia de salicilato 2 mM. Las muestras se obtuvieron de cultivos crecidos hasta una D.O₆₀₀ de 0,8 en MM + β HB 40 mM y +/- salicilato 2 mM.

A la vista de los resultados mostrados en la figura 27, se deduce que la expresión desde el promotor *Psal* inducible por salicilato resulta eficiente en TFA sólo en el caso en el que se elimina el atenuador *nasF* localizado entre dicho promotor y el gen *lacZ*. En ese caso, la expresión aumenta casi 9 veces comparado con el nivel basal de expresión sin salicilato. En caso contrario, si se mantiene el atenuador *nasF*, la expresión apenas registra un aumento de 1,5 veces en presencia del inductor, aunque los niveles basales de expresión disminuyen alrededor de 3 veces.

Confirmado el correcto funcionamiento del promotor regulable por salicilato, se concluyó que ambas construcciones serían de interés para la construcción del mutante en *cdnL*. Por un lado, la construcción sin el atenuador *nasF* aguas abajo de *Psal* (pMPO1140) permitía alterar el nivel de expresión 9 veces más o menos según se usara o no salicilato 2 mM. Por otro lado, la construcción con el atenuador (pMPO1129) que solo incrementa la expresión en 1,4 veces en presencia del inductor pero permite generar una expresión basal 3 veces más baja que la construcción sin el atenuador, podría ser de utilidad si se

requiriese un nivel muy bajo de expresión de *cdnL* para la apreciación de algún fenotipo o para evitar la letalidad de niveles mayores de expresión de *CdnL* si los menores niveles posibles de la otra construcción no fueran suficientemente bajos.

Se procedió, por tanto, a la construcción de los mutantes condicionales de *cdnL* tal y como se describe en el apartado 3.1.9 de Materiales y Métodos. Para esto, se emplearon los plásmidos pMPO1130 o pMPO1141 (Fig. 28), que portan una versión truncada del gen *cdnL* con objeto de que, tras la integración en el genoma de TFA, se regenerase un gen silvestre expresado bajo el promotor *Psal*. La única diferencia entre las dos construcciones es la ausencia en pMPO1141 del segundo atenuador *nasF* situado aguas abajo de *Psal*, permitiendo mayores niveles de expresión desde ese promotor. Para poder transferir estos plásmidos a TFA mediante conjugación, se clonó en ellos un *oriT*.

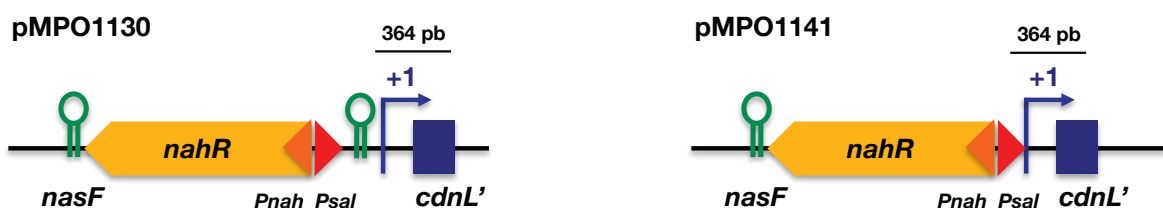


FIG. 28. Esquemas de los plásmidos pMPO1130 y pMPO1141 para la generación de los mutantes condicionales de *cdnL* en TFA. Ambos plásmidos (basados en pBluescript II SK+) portan una o dos copias del atenuador de la transcripción *nasF*, el gen para el activador transcripcional NahR (que actúa sobre los promotores *Psal* y *Pnah* en presencia de salicilato) y el fragmento de 364pb de *cdnL* usado para la recombinación homóloga (incluye su propio +1 y SD, pero no el promotor original)

La organización génica esperada en el cromosoma de *S. macrogolitabida* como consecuencia de la integración de uno u otro plásmido se resume en la figura 29.

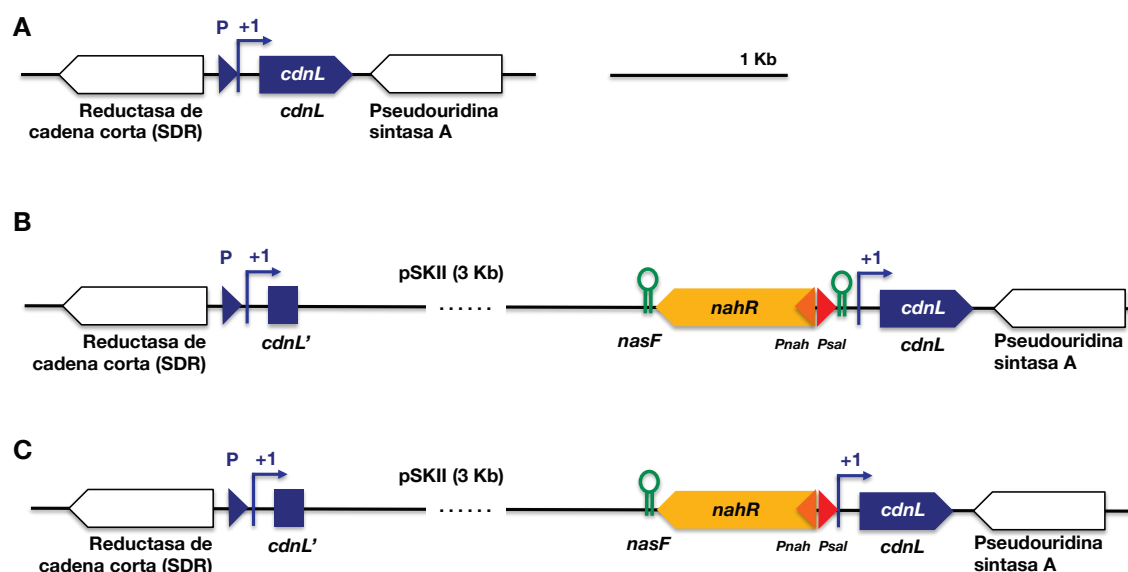


FIG. 29. Organización genética en TFA silvestre (A) y en los mutantes condicionales esperados tras la integración de los plásmidos pMPO1130 (B) o pMPO1141 (C). Se indican los elementos *nasF* (atenuador de la transcripción) y *nahR* (activador transcripcional de los promotores *Psal* y *Pnah* en presencia de salicilato). La integración de uno u otro plásmido daría lugar a dos versiones del gen en el cromosoma: una bajo su propio promotor pero incompleta (manteniendo sólo 165 pb de las 531 pb codificantes) y otra con su secuencia codificante completa pero bajo el control del promotor *Psal*.

Todos los intentos de introducir e integrar cualquiera de los dos plásmidos mediante conjugación o electroporación en TFA resultaron infructuosos. No se obtuvieron candidatos al seleccionar en medios con estreptomicina (la resistencia natural de TFA), ampicilina (resistencia que porta el vector pBluescriptII SK+) y salicilato 2 mM. El aumento de la concentración de salicilato a 3 o 5 mM tampoco mejoró el resultado. Aunque las células de TFA crecen tanto más lento cuanto mayor es la concentración de salicilato, su viabilidad no está comprometida en estas condiciones lo que descarta que el resultado negativo obtenido se deba a una posible toxicidad del salicilato.

Habiéndose confirmado anteriormente el correcto funcionamiento del promotor regulable por salicilato y ante la falta de éxito en la obtención de mutantes condicionales para *cdnL*, se decidió abandonar el intento de construcción de mutantes para este gen.

3.2. Construcción de un mutante carente de la proteína transductora de señales con dominios CBS

El primer dominio CBS descrito en la bibliografía fue identificado en una proteína de una arquea (Bateman, 1997), aunque hoy en día se sabe que es una estructura ampliamente distribuida en numerosas proteínas de procariotas y eucariotas. Los dominios CBS forman parte, por ejemplo, de la inosina monofosfato deshidrogenasa, la cistatión sintasa, los canales de cloro, algunas proteínas de transporte de membrana, las quinasas activadas por ATP y hasta ciertos factores de transcripción (Servant *et al.*, 2005, Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). El papel de los dominios CBS en algunas de estas enzimas es el de unir AMP, ATP o S-adenosil metionina y regular, en consecuencia, la actividad de la proteína de la que forman parte (Scott *et al.*, 2004). Dicha capacidad de unión de ligandos que contienen adenosina, ha conllevado que los dominios CBS sean considerados sensores de metabolitos intracelulares (Ignoul *et al.*, 2005). En otros casos, se ha demostrado que estas estructuras pueden funcionar como sensores de la fuerza iónica intracelular al formar parte de ciertos transportadores de membrana de tipo ABC (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006, Mahmood *et al.*, 2009) o que desempeñan un papel imprescindible en la función osmorreguladora del mismo tipo de transportadores (Chen *et al.*, 2007).

La proteína CBS, codificada por el gen 3768 de *S. macroglotabida* TFA y 14 veces más abundante en la condición de crecimiento en tetralina según los experimentos proteómicos, es una proteína pequeña de 141 residuos y que contiene un par de dominios CBS que abarcan casi la totalidad de su estructura primaria: del residuo 10 al 67 y del 72 al 131. En el genoma de *S. macroglotabida* TFA existen además, otras proteínas con dominios CBS y de función desconocida: las codificadas por los genes 3834, 1555 y 3994, de 144, 313 y 440 residuos, respectivamente. Estas proteínas presentan una identidad del 34% en el mejor de los casos con la proteína CBS identificada en los geles 2D-DIGE.

Ante la posibilidad de que la proteína CBS de *S. macroglotabida* TFA estuviera implicada en algún tipo de señalización relacionada con el proceso de represión catabólica, se procedió a la construcción de un mutante de sustitución del gen correspondiente por un gen de resistencia a kanamicina y al posterior estudio del fenotipo.

Para la construcción del mutante se empleó el plásmido suicida pMPO1126 que se construyó clonando 2 regiones de homología con las secuencias inmediatamente aguas arriba y aguas abajo del gen *cbs* flanqueando una resistencia a kanamicina (apartado 3.1.8 de Materiales y Métodos). Este plásmido se introdujo en TFA mediante conjugación y la obtención del mutante se llevó a cabo mediante dos procesos de selección consecutivos.

Tras la conjugación se seleccionaron, en primer lugar, los candidatos resistentes a kanamicina y tetraciclina (que debían haber integrado el plásmido mediante un único evento de recombinación). Tras comprobar la integración mediante PCR (no mostrado), los candidatos se cultivaron varios días en medio rico en ausencia de tetraciclina y se volvió a hacer un escrutinio de candidatos resistentes a kanamicina y sacarosa y sensibles a tetraciclina. Estos candidatos, obtenidos con una frecuencia aproximada de 5×10^{-6} , que debían haber perdido el plásmido mediante un segundo evento de recombinación, fueron comprobados por Southern Blot. En la figura 30 se muestra el Southern Blot realizado sobre ADN genómico de uno de los candidatos seleccionados.

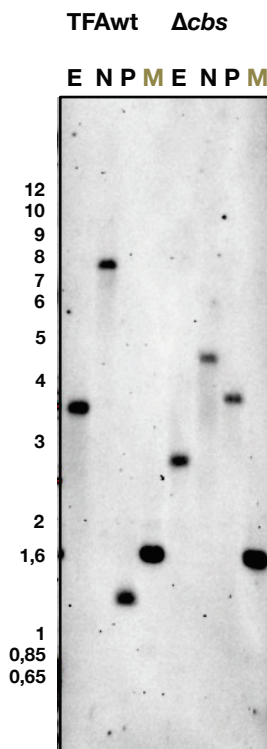


FIG. 30. Southern Blot de ADN cromosómico de TFA silvestre y del mutante $\Delta cbs::km$ (MPO816). En los geles se incluyó un marcador de tamaño (M) que también generó señal en su banda correspondiente a 1,6 Kb. En el lado izquierdo se especifican los tamaños de las bandas (en Kb). Se empleó como sonda el fragmento flanqueante aguas abajo a *cbs*. Se emplearon restricciones EcoRI (E), NcoI (N) y PvuI (P). Los tamaños esperados eran de 3,6, 8,4 y 1,2 Kb para TFA silvestre y de 2,7, 4,3 y 3,6 Kb para el mutante.

Una vez confirmado que el patrón de bandas obtenido en la hibridación era correcto, la nueva estirpe obtenida con la sustitución del gen *cbs* por el gen de resistencia a kanamicina se denominó MPO816.

3.2.1. Caracterización del fenotipo de crecimiento en la estirpe MPO816

En el caso de que la proteína con dominios CBS de *S. macroglutabida* TFA estuviera implicada en el fenómeno de represión catabólica y, por tanto, en la regulación del uso de las distintas fuentes de carbono, el crecimiento de la estirpe mutante podría verse alterado con respecto al que resulta característico de TFA silvestre. Para comprobar esta hipótesis, se comparó el crecimiento de la estirpe mutante y de TFA en presencia de tetralina o β -HB 40mM.

Los medios con tetralina se inocularon a partir de cultivos previos crecidos hasta D.O.₆₀₀ de 0,8 en MM con β -HB 8 mM y tetralina. Dicha concentración de β -HB sólo permite a las cultivos llegar hasta D.O.₆₀₀ de 0,4, por lo que el resto del crecimiento hasta 0,8 se produce a expensas de tetralina. El uso de las células en ese estado permite, por tanto, que el crecimiento al transferirlas a un medio con tetralina solo, no genere una fase de latencia excesivamente larga (observada cuando los pre-cultivos provienen de β -HB 40mM), ya que están previamente adaptadas al crecimiento en tetralina como única fuente de carbono y energía.

Por su lado, los cultivos para las curvas de crecimiento en MM con β -HB 40mM se inocularon con células cultivadas en el mismo tipo de medio hasta D.O.₆₀₀ de 0,8.

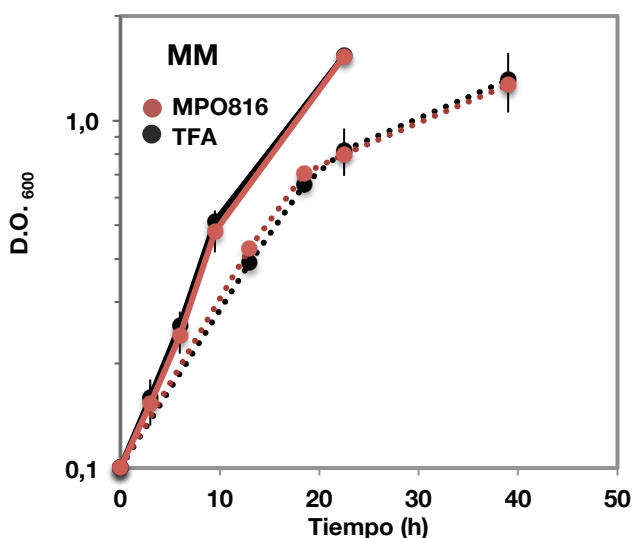


FIG. 31. Curvas de crecimiento de TFA y del mutante Δcbs (MPO816). Se muestra el crecimiento en MM + β -HB 40 mM en línea continua y en MM + tetralina en línea discontinua.

Atendiendo al resultado obtenido en las curvas de crecimiento (Fig. 31) puede afirmarse que el mutante MPO816 ($\Delta cbs::km$) no está afectado en el uso de ninguna de las dos fuentes de carbono que se analizaron, observándose en todo momento un crecimiento de tipo silvestre.

3.2.2. Caracterización de la inducción de los genes *thn* en la estirpe MPO816

El crecimiento del mutante en medio con tetralina como única fuente de carbono y energía indica que el mutante MPO816 puede inducir los genes de degradación a niveles suficientemente altos para sustentar el crecimiento a expensas de tetralina. A continuación, se analizó la posibilidad de que el mutante estuviera afectado en la capacidad de inducción de estos genes según la disponibilidad de fuentes de carbono alternativas. Con este propósito, se midió, mediante ensayo β -galactosidasa, el nivel de inducción de los genes *thn* a lo largo del tiempo al transferir los cultivos de la condición de no inducción (MM con β -HB 40 mM) a condiciones de represión catabólica (MM con tetralina y β -HB) ó condiciones de inducción (MM con tetralina). En el caso de los cultivos que simultaneaban tetralina y β -HB, se emplearon dos concentraciones distintas del ácido carboxílico, 20 y 40 mM, para observar en cada caso niveles de inducción *thn* distintos en la estirpe TFA silvestre.

Para los ensayos, se construyeron las estirpes MPO821 y MPO822 que resultaron de la integración de los plásmidos pIZ1002 y pIZ1003, respectivamente, en el cromosoma de la estirpe MPO816. Estos plásmidos portan en ambos casos la región intergénica entre *thnB* y *thnC* (por donde el plásmido se integra en el genoma gracias a un único evento de recombinación homóloga) y la fusión traduccional de uno u otro gen al gen *lacZ*. La integración de estos plásmidos da lugar, por tanto, a una duplicación del promotor y del codón de inicio del gen *thnB* o *thnC* en cada caso.

Como referencia de los niveles silvestres de expresión se hizo uso, además, de las estirpes TFA-1002 (TFA con fusión *thnC::lacZ*) y TFA-1003 (TFA con fusión *thnB::lacZ*). Como cabía la posibilidad de que el fenotipo de MPO816 fuera similar al del mutante MPO209, se utilizó también como control la estirpe MPO209-1002 (MPO209 con fusión *thnC::lacZ*) en estos ensayos.

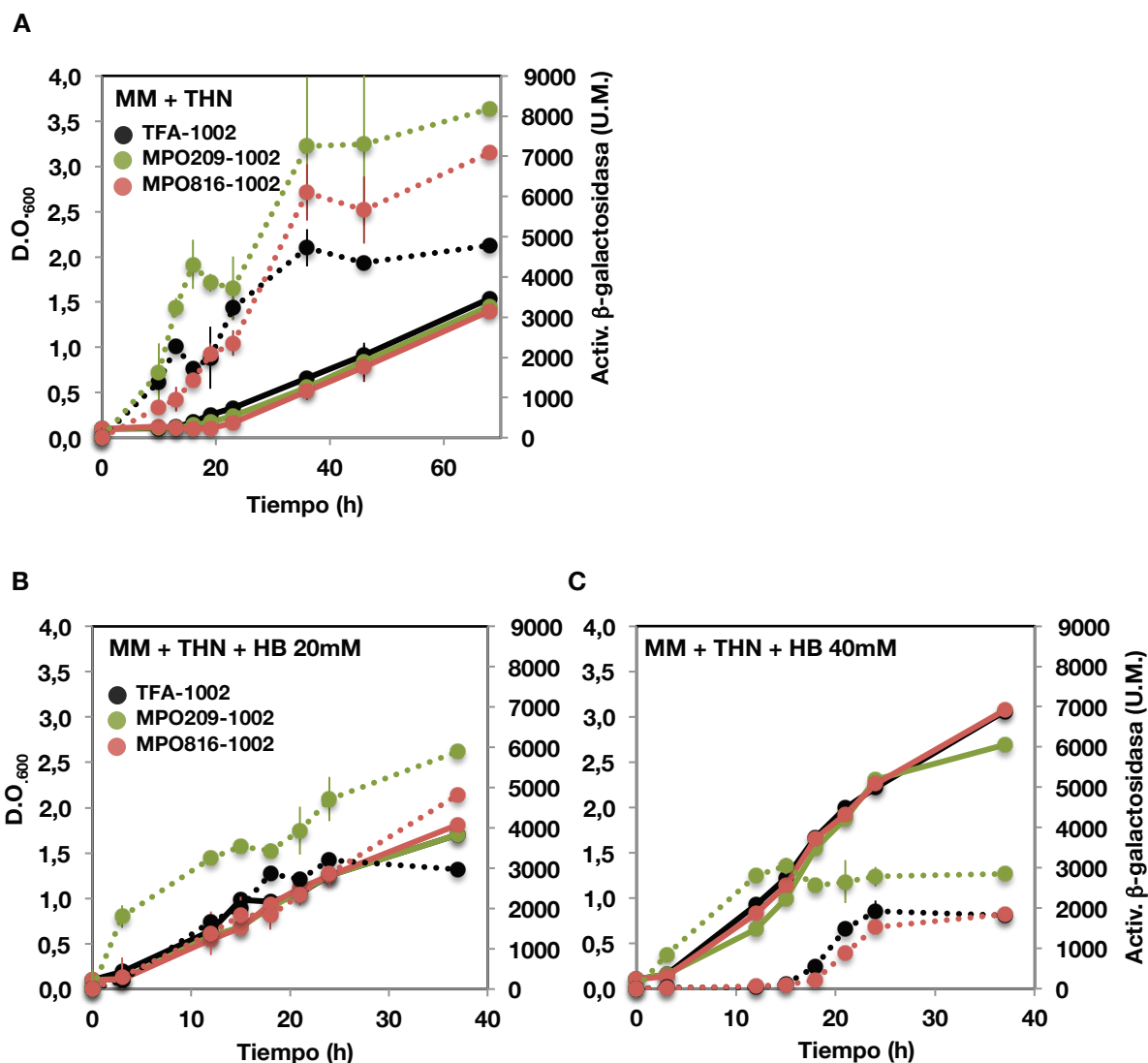


FIG. 32. Curvas de crecimiento y expresión de la fusión *thnC::lacZ* en TFA (TFA-1002), en MPO209 (MPO209-1002) y en el mutante MPO821 (MPO816-1002). Se representa el crecimiento en línea continua y el nivel de expresión *thnC* en línea discontinua. A. Ensayos en MM + THN; B. Ensayos en MM + THN + β -HB 20 mM, C. Ensayos en MM + THN + β -HB 40 mM. Todas las curvas de crecimiento e inducción se iniciaron a partir de pre-cultivos en MM + β -HB 40 mM.

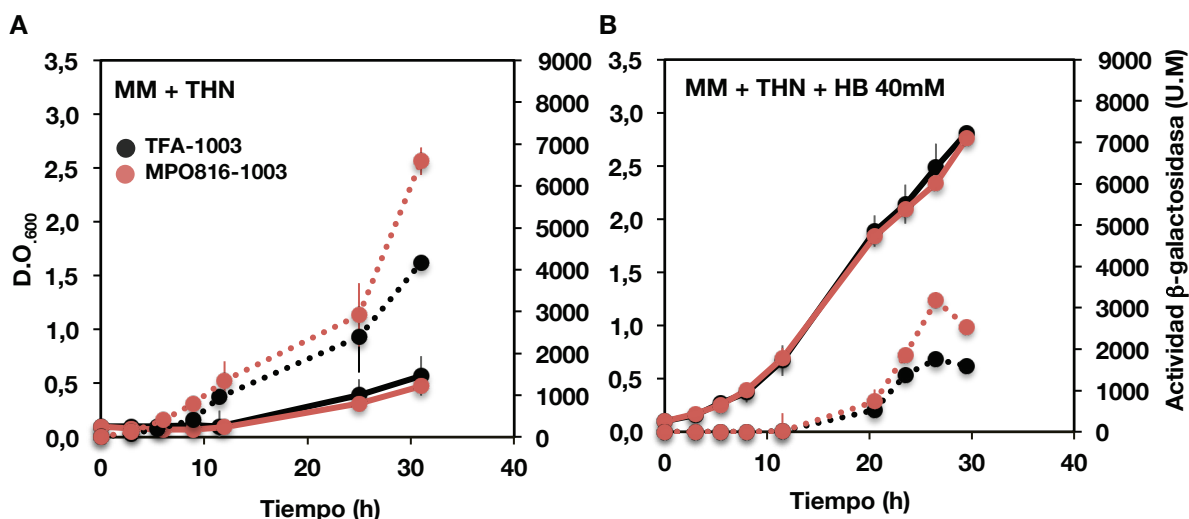


FIG. 33. Curvas de crecimiento y expresión de la fusión *thnB::lacZ* en TFA (T1003) y en el mutante MPO822 (MPO816-1003). Se representa el crecimiento en línea continua y el nivel de expresión *thnC* en línea discontinua. A. Ensayos en MM + THN; B. Ensayos en MM + THN + β-HB 40 mM. Todas las curvas de crecimiento e inducción se iniciaron a partir de pre- cultivos en MM + β-HB 40 mM.

Los resultados obtenidos (Fig. 32 y 33) demuestran que la estirpe mutante MPO816 es capaz de inducir la expresión de los genes *thn* en el tiempo y en los niveles habituales de TFA. El único efecto inusual observado es el de una inducción mayor en el mutante que en TFA silvestre en los tiempos muy largos de las condiciones de inducción (MM con tetralina) y para ambas fusiones génicas.

3.2.3. Caracterización de la represión catabólica sobre los genes *thn* en la estirpe MPO816

Con el fin de analizar si el mutante Δcbs mantenía la capacidad de reprimir catabólicamente los genes *thn*, se midió la expresión de los genes *thnB* y *thnR* mediante RT-qPCR tras la aplicación del estímulo de represión catabólica (adición de β-HB 40 mM) a cultivos crecidos en tetralina hasta fase exponencial.

Las muestras de la estirpe MPO816 y de TFA se recogieron de los cultivos en tetralina a una $DO_{600} = 0,7-0,8$ (muestra del tiempo cero) y pasados 3, 6 y 9 minutos tras la adición de β-HB 40 mM al medio. También se recogieron muestras en tiempos 60, 180 y 300 minutos para TFA y 120 minutos para la estirpe MPO816. Como control, se analizó en

paralelo la expresión de los mismos genes en TFA sin aplicar en este caso el estímulo (se adicionó agua en lugar de β -HB 40 mM al medio de cultivo).

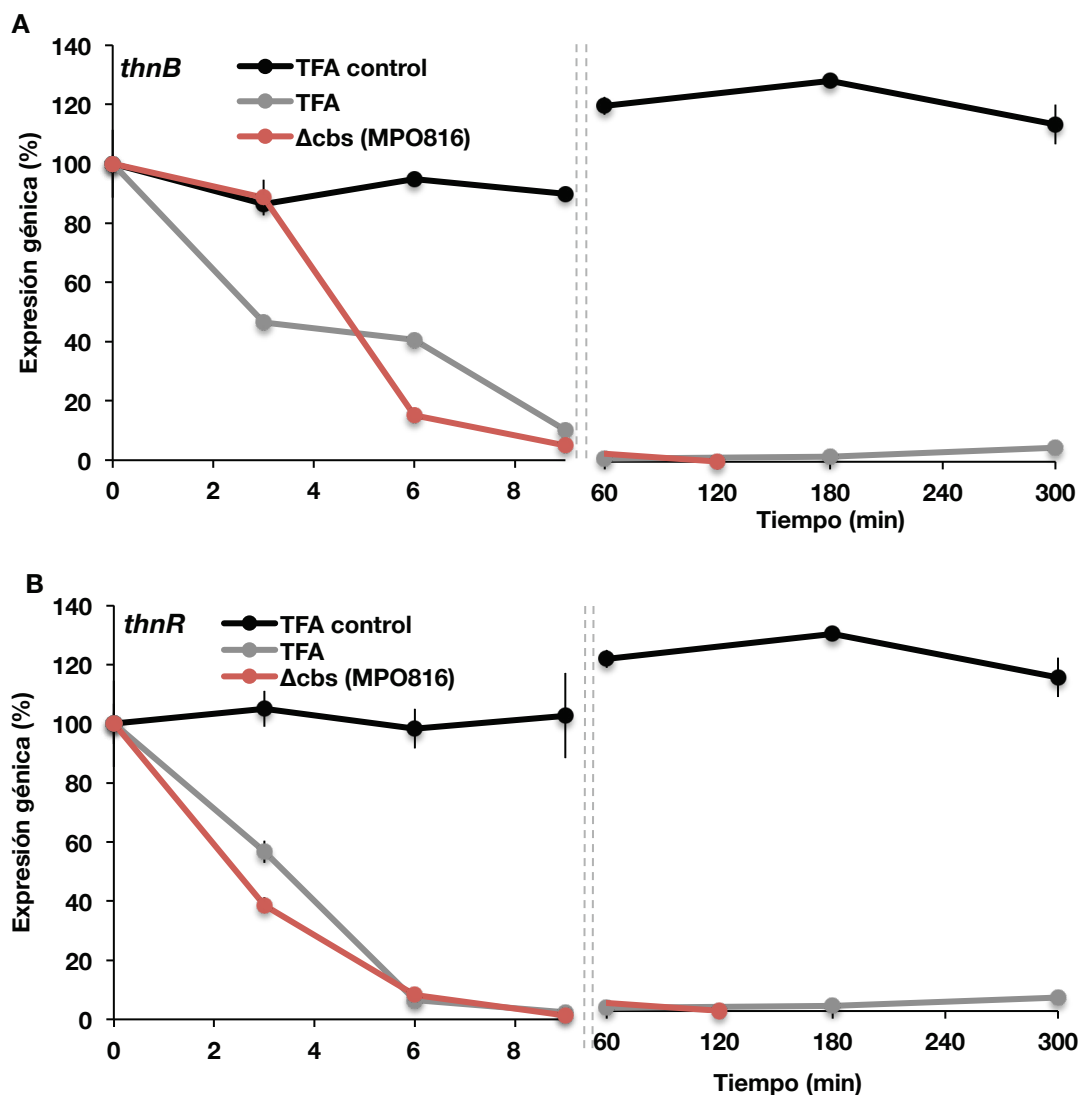


FIG. 34. RT-qPCR de los genes *thnB* (A) y *thnR* (B) tras el estímulo de represión catabólica en TFA y en el mutante MPO816. El cDNA de cada estirpe se obtuvo de un cultivo que había sido crecido en MM + tetralina hasta fase exponencial y al que se añadió β -HB 40mM tras el tiempo cero, momento a partir del cual se recogieron muestras a distintos tiempos. En el caso de la muestra control de TFA se adicionó agua en lugar de β -HB. El nivel de expresión se analizó mediante RT-PCR y está indicado como porcentaje del observado en el tiempo cero, justo antes del estímulo de represión catabólica. Se muestra el resultado de dos réplicas biológicas.

Este análisis de expresión de los genes *thn* puso de manifiesto que el mutante responde a la fuente de carbono preferencial del mismo modo que TFA silvestre, es decir, disminuyendo rápidamente la expresión de los genes *thn* (Fig. 34). Además, esta disminución se mantiene a lo largo del tiempo como se muestra en la zona de la derecha de cada gráfica.

Teniendo en cuenta el total de los resultados obtenidos para el mutante MPO816, se confirmó que la proteína con dominios CBS no está implicada en el proceso de represión catabólica.

4. Construcción de mutantes de *S. macroglutabida* TFA en elementos implicados en represión catabólica previamente descritos en otras bacterias.

Como se describe en el apartado de Introducción de esta tesis, los experimentos de mutagénesis exhaustiva para la búsqueda de elementos implicados en el fenómeno de represión catabólica no consiguieron identificar en ningún caso genes distintos al de la sintetasa de gránulos de PHB, *phaC*. Por otro lado, los experimentos a nivel proteómico arrojaron información sobre el estado fisiológico de *S. macroglutabida* TFA en las condiciones de represión catabólica, pero tampoco consiguieron identificar posibles piezas claves del entramado molecular que sustentaran de manera directa la regulación de dicho fenómeno. Teniendo esos precedentes en cuenta y estando disponible en nuestro laboratorio la secuencia del genoma de *S. macroglutabida* TFA, se planteó la mutagénesis de otros genes que tuvieran similitud con genes implicados en represión catabólica en otras bacterias.

Tras la búsqueda bibliográfica e informática de elementos implicados en represión catabólica con posibles homólogos en el genoma de *S. macroglutabida* TFA se seleccionó, por un lado, al regulador transcripcional FixJ, similar a BphQ de *Acidovorax sp.KKS102* (Ohtsubo et al., 2006) y a la proteína AccR de *Azoarcus sp. CIB* (Valderrama et al., 2013), ambos implicados en la represión catabólica de los genes *bph* y *bzd*, respectivamente, y, por otro lado, a los componentes Hpr y HprK del sistema PTS, por homología con aquellos descritos para *Sinorhizobium meliloti* (Pinedo et al., 2008, Pinedo et al., 2009) y también implicados en el mismo proceso.

4.1. Construcción de mutantes carentes del sistema de dos componentes FixLJ

Gracias a la secuenciación del genoma de *S. macroglotabida* TFA, pudieron localizarse 2 copias de genes *fixJ* (denominados así por su homología con los reguladores implicados en la fijación de nitrógeno; Gilles-Gonzalez *et al.*, 1993) que codifican para reguladores transcripcionales de sistemas de dos componentes y cuyos productos presentan un 39% y 42% de identidad con la proteína BphQ de *Acidovorax* y un 45% y 43% con la proteína AccR de *Azoarcus*. El alineamiento de estas secuencias mediante el programa ClustalW se muestra en la figura 35. Las dos proteínas FixJ de TFA presentan un 71% de identidad entre sí. Al igual que en el caso de *Acidovorax*, ambas copias de genes *fixJ* de TFA ("*fixJ_1*" y "*fixJ_2*"), están precedidas por genes codificantes para quinasas sensoras ("*fixL_1*" y "*fixL_2*"), que presentan, en este caso, un menor grado de identidad con respecto a la proteína BphP de *Acidovorax sp. KKS102*, esto es, un 23% y un 29%, respectivamente. Las dos proteínas FixL de TFA comparten un 70% de identidad.

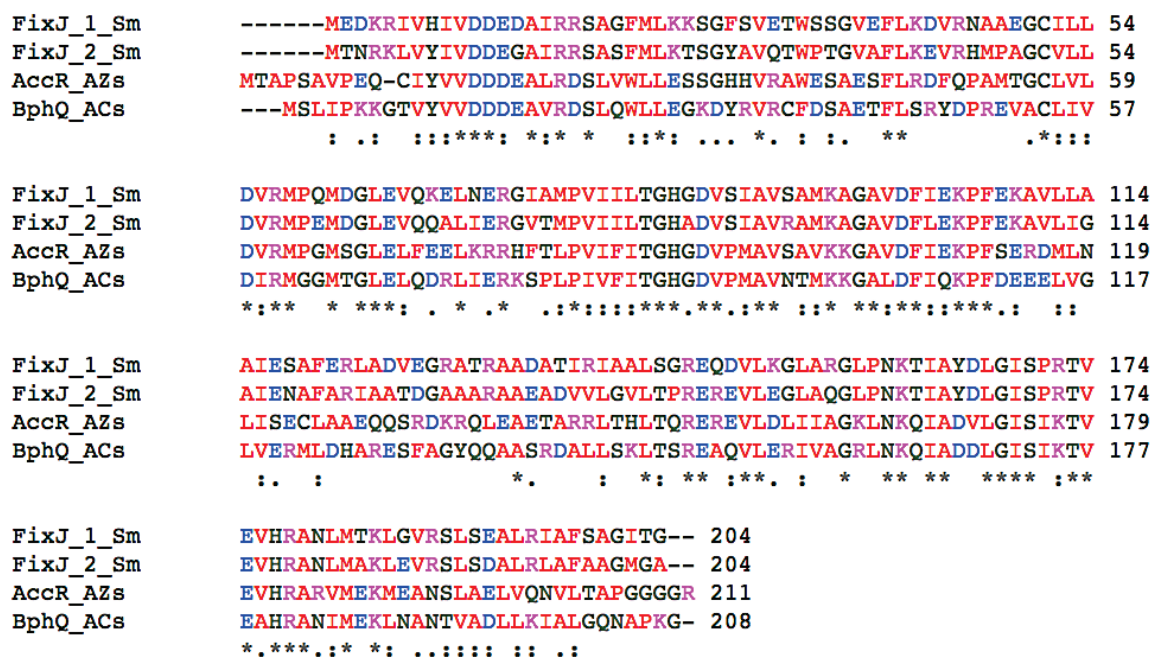


FIG. 35. Alineamiento de las proteínas FixJ de *S. macroglotabida* TFA, AccR de *Azoarcus sp. CIB* y BphQ de *Acidovorax sp. KKS102*. Se muestra el alineamiento de secuencia obtenido mediante ClustalW para las proteínas FixJ, AccR (código Uniprot V9P497) y BphQ (código Uniprot Q1HAX0). Se señala con asterisco los aminoácidos idénticos en todas las proteínas y con doble punto aquellas sustituciones conservativas. El código de colores indica: residuos pequeños e hidrofóbicos (rojo), ácidos (azul), básicos (magenta), con grupos hidroxilo, sulfhidrilo o amino (verde).

El parecido entre las proteínas FixJ de *S. macrogolitabida* TFA y las proteínas BphQ de *Acidovorax* o AccR de *Azoarcus* se confirma también por la presencia de dominios proteicos similares, ya que todas ellas contienen dominios REC y dominios LuxR-c-like (Fig. 36). Los primeros, son característicos de las proteínas reguladoras que forman parte de un sistema de dos componentes (Galperin, 2006), y contienen comúnmente un sitio susceptible de ser fosforilado por una quinasa sensora. Por su parte, los dominios LuxR constituyen estructuras de unión a ADN y son característicos de reguladores de la transcripción que poseen un dominio “receptor de señal” en su lado amino-terminal. La fosforilación en este último dominio modula la unión del dominio carboxilo-terminal al ADN (Chen *et al.*, 2011) o su multimerización (Tuckerman *et al.*, 2001).

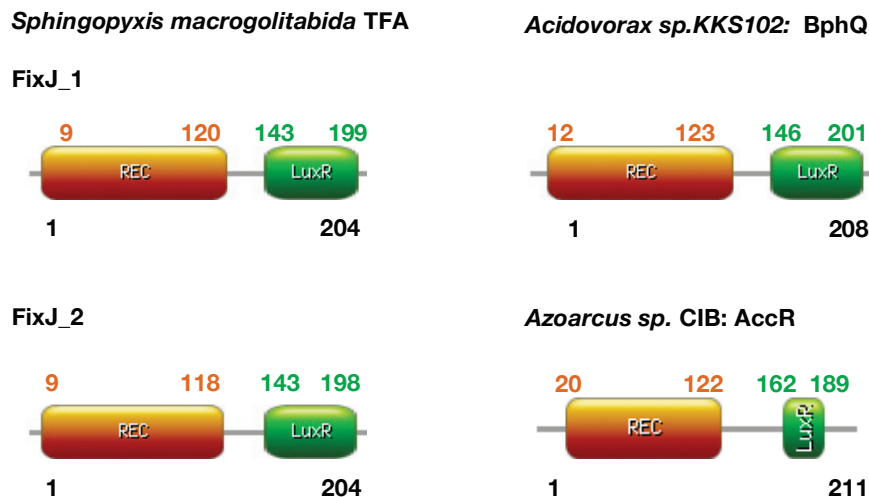


FIG. 36. Dominios de las proteínas FixJ, BphQ y AccR. Se muestran los dominios de las proteínas FixJ (*S. macrogolitabida* TFA), BphQ (*Acidovorax* sp.KKS102) y AccR (*Azoarcus* sp. CIB) según predicción de Blastp e InterPro.

En cuanto a los dominios de FixL de *S. macrogolitabida* TFA y BphP de *Acidovorax* sp. KKS102 hay que decir que ambas proteínas sensoras comparten 3 tipos de dominios (Fig. 37): dominio PAS, dominio HisKA y dominio HATPasa, si bien es cierto que el dominio PAS está duplicado en las proteínas FixL de *S. macrogolitabida* TFA. Estos 3 tipos de dominios son característicos de las proteínas sensoras de los sistemas de dos componentes. El dominio PAS es habitual en proteínas transductoras de señales que responden a luz, potencial redox, oxígeno, estado energético ó actividad de la cadena transportadora de electrones (Bibikov *et al.*, 2000, Moglich *et al.*, 2009, Sarand *et al.*, 2008,

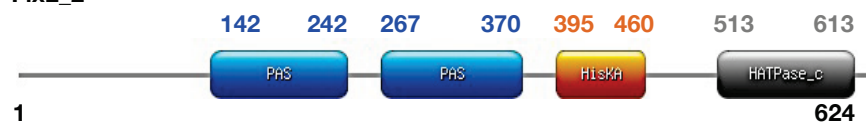
Taylor *et al.*, 1999, Taylor *et al.*, 1999). En otros casos, los dominios PAS están además implicados en la respuesta a intermediarios del ciclo de Krebs, como el succinato o el fumarato (Jelesko *et al.*, 1994 Kneuper *et al.*, 2005, Moglich *et al.*, 2009). Por su lado, los dominios HisKA son dominios del tipo histina-quinasa A, y suelen presentar un residuo de histidina conservado que se autofosforila. Finalmente, los dominios HATPase pertenecen a ATPasas de tipo histidina-quinasa y son característicos de proteínas que unen ATP.

***Sphingopyxis macrogolitebida* TFA**

FixL_1



FixL_2



***Acidovorax* sp.KKS102: BphP**

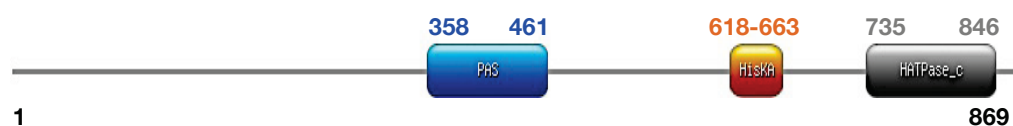


FIG. 37. Dominios de las proteínas FixL y BphP. Se muestran los dominios de las proteínas FixL (*S. macrogolitebida* TFA) y BphP (*Acidovorax* sp.KKS102) según la predicción de los programas Blastp e InterPro.

Aunque en el genoma de TFA existen diversos sistemas de dos componentes sin una función obvia y que pudieran también estar implicados en este tipo de regulación, la semejanza de las proteínas FixJ de *S. macrogolitebida* TFA con los reguladores de represión catabólica de *Acidovorax* y *Azoarcus*, motivó que se construyera una batería de mutantes de inserción y/o deleción en los genes correspondientes de *S. macrogolitebida* TFA con la intención de comprobar la posible implicación de los reguladores transcripcionales FixJ ó del sistema completo de dos componentes FixL-FixJ en el fenómeno de represión catabólica. Un esquema de la organización génica en cada mutante construido se muestra en la figura 38.

Para la construcción de los mutantes MPO801, MPO803, MPO804, MPO808, MPO811 y MPO812 se emplearon los plásmidos pMPO1127, pMPO1128, pMPO1131 y pMPO1142, según en apartado 3.1.8 de Materiales y Métodos. Tras los eventos de recombinación de estos plásmidos con el cromosoma de TFA, la organización génica de todos los mutantes fue comprobada por Southern blot (no mostrado).

Para el estudio del fenotipo de las estirpes mutantes obtenidas se procedió al análisis de su crecimiento en diferentes fuentes de carbono y al estudio de la inducción de los genes *thn* mediante la medida de la actividad enzimática de ThnC (extradiol dioxigenasa).

4.1.1. Caracterización del fenotipo de crecimiento en los mutantes *fixLJ*.

Dada la hipótesis de que los reguladores FixJ y/o las quinasas sensoras FixL de *S. macroglutabida* TFA pudieran estar implicados en el fenómeno de represión catabólica y, por tanto, en la regulación del uso de las distintas fuentes de carbono, resultaba plausible considerar que el crecimiento de las estirpes mutantes pudiera verse alterado con respecto al que resulta característico de TFA silvestre. Sobre todo, en el caso de que alguno de los reguladores FixJ resultara ser un activador transcripcional imprescindible para la expresión de los genes de degradación de tetralina, como ocurre con BphQ y la expresión del operón *bph* en *Acidovorax* sp. KKS102. En ese caso, se esperaría una incapacidad de crecimiento en esta fuente de carbono.

Por ello, se comparó el crecimiento de las 6 estirpes mutantes (MPO801, MPO803, MPO804, MPO808, MPO811 y MPO812) con el de TFA en MM con tetralina o β -HB 40 mM. Para el inicio de las curvas de crecimiento se emplearon pre-inóculos en las mismas condiciones que las ya descritas para el caso de la estirpe MPO816.

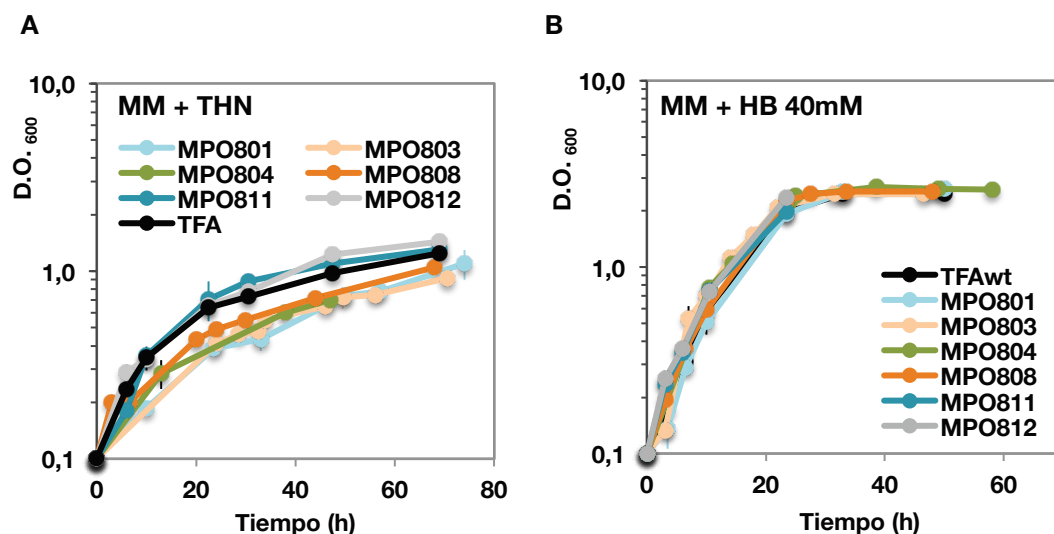


FIG. 39. Crecimiento de TFA y de los mutantes en *fixL*, *fixJ*. Se representa el crecimiento de TFA y de los mutantes MPO801, MPO803, MPO804, MPO808, MPO811 y MPO812 en MM suplementado con tetralina (A) o con β -HB 40 mM (B). Las curvas de crecimiento en tetralina se iniciaron a partir de cultivos en MM + tetralina + β -HB 8 mM y las curvas en β -HB 40 mM, a partir de preinóculos en este mismo medio.

Como puede observarse en la figura 39, ninguno de los mutantes presentó un crecimiento distinto al de TFA silvestre, conservándose los tiempos de generación dentro del intervalo habitual para ambas fuentes de carbono ($12,5 \pm 2$ h en tetralina y $3,5 \pm 0,2$ h en β -HB 40 mM). Puesto que se mantuvo el crecimiento ordinario en tetralina, se confirmó que los reguladores FixJ no son activadores imprescindibles de los genes *thn*. No obstante, no podía descartarse que el sistema de dos componentes, o sus elementos por separado, actuaran como represores de los genes *thn* en condiciones de represión catabólica. En ese caso, la eliminación de los elementos reguladores en los mutantes debería conllevar un fenotipo de desrepresión catabólica con respecto a lo observado en TFA. Con objeto de testar esta posibilidad se midió la actividad de ThnC en estos mutantes en las diferentes fuentes de carbono.

4.1.2. Caracterización de la actividad ThnC (extradiol dioxigenasa) en los mutantes *fixLJ*

Para los ensayos enzimáticos se emplearon células enteras de cultivos crecidos hasta fase exponencial en medio mínimo suplementado con tetralina (condiciones de inducción *thn* en TFA) o con tetralina y β -HB 40 mM simultáneamente (condiciones de

represión catabólica). Se ensayó la capacidad de ThnC de convertir el sustrato comercial 2,3-dihidroxibifenilo en el producto colorimétrico 6-fenil-HODA medido espectrofotométricamente a 343 nm (apartado 4.4 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Estirpe de TFA	Actividad ThnC (nmoles/min)	
	MM + THN	MM+ THN + β -HB 40mM
Silvestre	3,8	0,31
MPO801 (<i>fixJ_1::ap</i>)	5,8	0,35
MPO803 (Δ <i>fixJ_2::km</i>)	3,9	0,11
MPO804 (<i>fixJ_1::Ap</i> , Δ <i>fixJ_2::km</i>)	2,8	0,19
MPO808 (Δ <i>fixLJ_2::km</i>)	3,2	0,24
MPO811 (Δ <i>fixLJ_1::ap</i>)	7,0	0,16
MPO812 (Δ <i>fixLJ_1::ap</i> , Δ <i>fixLJ_2::km</i>)	5,9	0,14

Tabla 13. Actividad ThnC en TFA silvestre y en los mutantes *fixL*, *fixJ*. El ensayo se realizó con células enteras de cultivos crecidos hasta D.O.₆₀₀ de 0,8 en condiciones de inducción (MM suplementado con tetralina) o de represión catabólica (MM + tetralina + β -HB 40 mM). La actividad se expresa en mU.

Los resultados (tabla 13) pusieron de manifiesto que ninguno de los mutantes alcanzaba, en condiciones de represión catabólica, un nivel de actividad ThnC similar al del crecimiento en tetralina, descartando la posibilidad de que los genes de degradación de tetralina estuvieran desreprimidos. Se concluyó, por tanto, que los genes *fixL* y *fixJ* de *S. macroglutabida* TFA estuvieran implicados en represión catabólica.

4.2. Construcción de mutantes carentes de componentes del sistema fosfotransferasa (PTS)

Tal y como se ha descrito en la introducción de esta Tesis, el sistema clásico fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa o PEP-PTS es un sistema multiproteico de transferencia de grupos fosfato que acopla el transporte de azúcares a través de la membrana con la fosforilación de esos carbohidratos. Permite por tanto, en muchas bacterias, la detección

de fuentes de carbono preferenciales en el medio, contribuyendo así a la base molecular de la represión catabólica. En otras bacterias, sin embargo, existe un sistema PTS no canónico carente de los componentes EIIB y EIIC para el transporte de azúcares y que puede aún, en algunos casos, funcionar como sensor de las fuentes de carbono preferenciales. Es el caso, por ejemplo, del sistema PTS y la represión por succinato en *S. meliloti* (Garcia *et al.*, 2010). En cualquiera de los dos casos, las respuestas fisiológicas y reguladoras que se generan como parte del proceso de represión catabólica dependen, en la mayoría de las distintas bacterias, del estado de fosforilación de las proteínas Hpr y EIIA de dicho sistema PTS (Gunnewijk *et al.*, 2000, Viana *et al.*, 2000, Warner *et al.*, 2003).

Gracias a la secuenciación y anotación disponible en nuestro laboratorio del genoma de *S. macrogolitabida* TFA, pudimos identificar varios genes homólogos a aquellos pertenecientes al sistema fosfotransferasa de otras bacterias. Por un lado, los genes que codifican para la quinasa HprK (gen 3852), para la proteína EIIA^{Fru} (gen 3854) y para Hpr (gen 3855) de *S. macrogolitabida* TFA se encuentran cercanos en el cromosoma y se expresan en la misma dirección (Fig. 40). Aguas abajo del gen *hprK* se encuentra el gen 3853 cuyo producto es similar a YhbJ, una proteína de unión a ARN que regula la degradación del pequeño ARN GlmZ, implicado a su vez en la regulación de la transcripción del gen *glmS*, que codifica la enzima que sintetiza glucosamina-6-fosfato, compuesto imprescindible para la síntesis de pared celular (Kalamorz *et al.*, 2007). En el caso del gen para el componente EIIA, la secuencia codificante está solapada a la del gen 3855 que se encuentra aguas abajo (Fig. 40). A pesar de que el gen 3855 está anotado como *ptsH* y codificante de la proteína HPr en el genoma de TFA, la secuencia del producto proteico presenta una mayor similitud con la proteína NPr (95% de cobertura, 32% de identidad), codificada por *ptsO* de *E. coli* que con HPr (90% de cobertura, 30% de identidad) de la misma bacteria.

Distanciados de esos cuatro genes, existen en el cromosoma de TFA otros genes que codifican para un componente EI^{Ntr} (gen 1562), una proteína HprK_rel_A (“HprK-related kinase A”; gen 2137) y 2 proteínas PtsN (genes 173 y 286) (Fig. 40). Sin embargo, esta bacteria carece de homólogos de los componentes del sistema PTS directamente relacionados con el transporte de azúcares, las proteínas EIIB y EIIC.

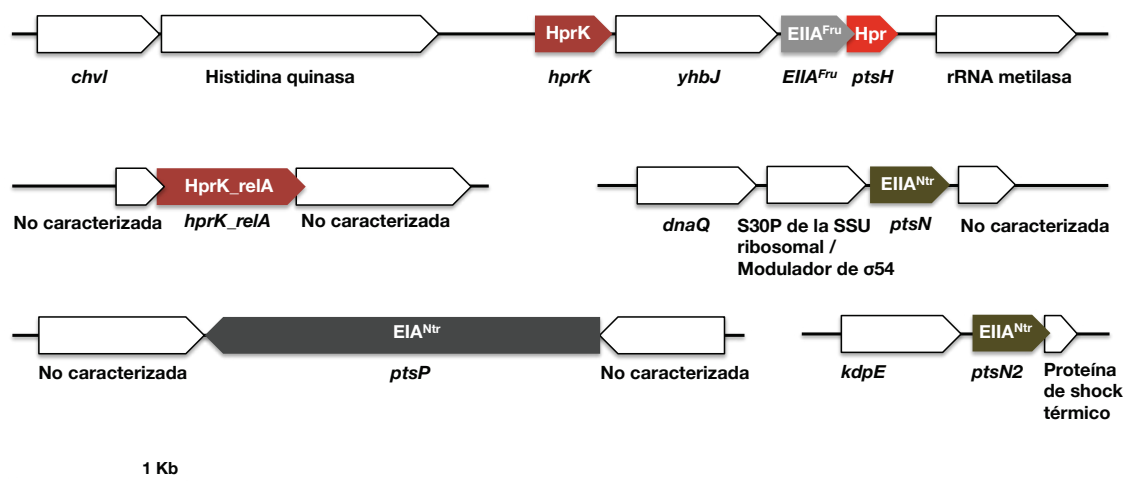


FIG. 40. Organización genética de los componentes del sistema PTS existentes en TFA. Se resaltan los genes homólogos a los componentes del sistema clásico PTS o a los del sistema PTS relacionado con la regulación del nitrógeno y su entorno génico en el cromosoma de TFA. El gen *hprK_relA* codifica realmente para una quinasa A con parecido a las proteínas HprK.

Las proteínas HprK, EIIA, Hpr y EI de *S. macrogolitabida* TFA presentan una gran similitud con las equivalentes de *S. meliloti* (tabla 14), bacteria en la que se ha demostrado la implicación de los componentes HprK, EIIA (o ManX) y HPr en el fenómeno de represión catabólica (Pinedo *et al.*, 2008, Pinedo *et al.*, 2009). La proteína HPrK_relA, sin embargo, tiene una longitud mayor que la proteína HPrK de *S. meliloti* y casi idéntica (288 residuos) a la de *B. subtilis* (310 residuos) (Fig. 45).

	Cobertura	Identidad	Similitud
HprK_relA	18 %	41 %	62 %
HprK	89 %	36 %	52 %
Hpr	90 %	54 %	63 %
EIIA^{Fru}	91 %	62 %	80 %
EIA^{Ntr}	97 %	45 %	65 %

Tabla 14. Nivel de parecido de las proteínas PTS de *S. macrogolitabida* TFA con respecto a las homólogas de *S. meliloti*. Se muestran el porcentaje de cobertura, identidad y similitud obtenido mediante blastp de las proteínas de *S. macrogolitabida* frente a las correspondientes de *S. meliloti* (HprK, código Uniprot Q92KV2; HPr, código Uniprot Q92TC0; EIIA, código Uniprot Q92TB9 y EIA^{Ntr}, código Uniprot Q92MK4)

La proteína Hpr de *S. macroglotabida* conserva, además, el residuo de histidina que se fosforila comúnmente en otras bacterias durante el transporte de carbohidratos, así como el residuo de serina que es fosforilado por la quinasa HprK en Gram-positivas y en *S. meliloti* durante el control de represión catabólica (Fig. 41).

```

Sme_Q92TC0      MDHRPDTALTRELLIVNKRGLHARASAKFVQTVETFDAEITVS--KDGMTVGGT SIMGLM 58
Sm              MSEASET-----VEITNQRLHARASAKFVTFVSRLPETVTVEVEKGGSRVNGT SIMGLM 55
                *.. .:*      : *.*:***** * . : :*. *.* *.******

Sme_Q92TC0      MLAASTGCSVFVTASGAQAEALNALDRLVRDRFG EEM 96
Sm              MLGAAKGSITITHTSGDGADTALLKLVGLVKDSFGED- 92
                **.*:. * * : : ** * : * * **:* **:
```

FIG. 41. Alineamiento de las proteínas Hpr de TFA (Sm) y *S. meliloti* (Sme, código Uniprot Q92TC0). El alineamiento se llevó a cabo mediante ClustalW2. Se indica en naranja el residuo de histidina que es fosforilado por el componente El y, en rojo, el residuo de serina que se fosforila por HprK en *S. meliloti*.

Por otro lado, la enzima HprK de esta α -proteobacteria, mantiene en su secuencia (al igual que en el caso de *S. meliloti*) el residuo de histidina, los 2 aspárticos y la arginina que, está descrito, interaccionan con la serina fosforilable de Hpr (Fig. 42).

```

Sme_Q92KV2      -----MNAPFVN VHGTAIVL GTTGLLITGPSGSGKSALALSCLSEVRHRGRFAALVADDR 55
Sm              MLSSRTVPEIVNIHASCVAAGRRGILLGPSGLGKSDLALRLIDRG-----ARLVADDR 54
                . :*: * .: . . * * :*: **** * * * * :.. * *****

Sme_Q92KV2      VDLTLENGRIVARCPAAIRGLIEIRGSGIAEVDTVSACVLDWAIMPVRAPFDPRLPPEEE 115
Sm              CDVWRQDGALWCRPPEALEGKLEVRGIGIVEQPFAAPVPLALAVR--LADRYDRMPNPGE 112
                *: : * : . * * *: . :*: * * * * .:. * *: * * : *

Sme_Q92KV2      LQLEIGRNLP LLRLPVEGPLSPVDALAALLPQI--- 148
Sm              VETVAGHPLPALRLSAFEASAPIKVMLALDRLATPA 148
                :: * : * * * * . . :*: .: : * *
```

FIG. 42. Alineamiento de las proteínas HprK de TFA (Sm) y de *S. meliloti* (Sme, código Uniprot Q92KV2). El alineamiento se llevó a cabo mediante ClustalW2. Se indican en amarillo los residuos de histidina, aspártico y arginina que interaccionan comúnmente con la serina de Hpr.

La proteína HPrK_{relA}, sin embargo, solo conserva tres de los cuatro residuos: el de histidina, uno de los aspárticos y el de arginina (Fig. 43). Finalmente, el potencial sistema PTS de *S. macroglotabida* comparte con el de *S. meliloti* la ausencia de los componentes EIIB y EIIC.

```

Bs_034483      MAKVRTKDVMEQFNLELISGEEGINRPITMSDLRSPGIEIAGYFTYYPRERVQLLGKTEL 60
Sme_Q92KV2     -----
Sm            ---VRHGTRLAVGPVQFRIG-----SDWAAPIAALNRLYASYPRDDDRPADATVR 47

Bs_034483      SFFEQLPEEEKKQRMDSLCTDVTPAIILSRDMPIQELIDASEKNGVPVLRSPKTTRLS 120
Sme_Q92KV2     -----
Sm            LFAAR-----PWRRWLRPSVQIGGDFTPDALP-----LPLSMGLLAAE 86

Bs_034483      SRLTNFLESRLAPTTAIGHVLVDIYGVGVLTGKSGVGKSETALELVKRG-HR-----LV 174
Sme_Q92KV2     -----MNAPFVNVGHTAIVLGTGTLITGPSGSGKSALALSCLSEVRHRGRFAALV 51
Sm            MGMNLQVALGWRRHLLHSAVAKDGRAAILSGESGSGKSTLAALLGEDGWRLMGDEFTL 146
                : * . : . : : * * * * . : :

Bs_034483      ADDCV--EIRQEDQDTLVGNAPELIEHLEIRGLGIINVMTLFGAGAVRSNKRITIVMNL 232
Sme_Q92KV2     ADDR--DLTLEN-GRIVARCPAAIRGLIEIRGSGIAEVDTVS-----ACVLDW 97
Sm            VDPASGDALAFPRAVSLKNAIAEVAARVDPARLGPLLAGTPKGDIRHLIPRADAVAAMH 206
                . * : : . : : : * . * : .

Bs_034483      ELWEQGGQYD-RLGLEEETMKIIDTEITKLTIPVRPGRNLAVIEVAAMNFRKRMGLNA 291
Sme_Q92KV2     AIMPVRAPFDPRLPPEEELQLEIGRNLPLLRLPVEG-----PLSP 137
Sm            DPVRPALLLFPFPGGEAAVEPMGEAEFVRLTEASTNYVALGETGFSALLRLVRETPAFA 266
                * : * : . .

Bs_034483      AEQFTNKLADVIEDGEQEE--- 310
Sme_Q92KV2     VDALAALLPQI----- 148
Sm            VSYPD SATGMALVDRLWAEAAAR 288
                **

```

FIG. 43. Alineamiento de la proteína HprK_{relA} de TFA (Sm) con HPrK de *S. meliloti* (Sme, código Uniprot Q92KV2) y HPrK de *B. subtilis* (Bs, código Uniprot O34483). El alineamiento se llevó a cabo mediante ClustalW2. Se indican en amarillo los 3 residuos conservados en TFA de los 4 que generalmente interactúan con la serina de Hpr.

Dado el alto parecido con el sistema PTS de *S. meliloti*, este fue tomado como referencia para poder determinar la posible implicación del sistema PTS de *S. macroglotabida* TFA en el fenómeno de represión catabólica. En *S. meliloti*, los mutantes de delección de *hprK* o *hpr* generan las principales alteraciones en el fenotipo de represión catabólica, incrementando o disminuyendo la intensidad de dicho fenómeno, respectivamente (Pinedo *et al.*, 2008, Pinedo *et al.*, 2009). Teniendo esta información en consideración, se planteó la construcción de mutantes de delección o sustitución en los mismos componentes de *S. macroglotabida* TFA.

4.2.1. Construcción y caracterización de un mutante carente de HprK_{relA} en TFA

Debido a que el ensamblaje del genoma de TFA y su posterior anotación estructural y funcional han evolucionado en paralelo al trabajo de esta tesis, la información inicial de la que se dispuso para el diseño de los mutantes del sistema PTS no fue la definitiva. En este

sentido, hay que mencionar que en el momento en que se inició el estudio del sistema PTS de *S. macroglotabida*, la anotación del genoma carecía del gen *hprk* que actualmente sabemos está situado junto a los genes codificantes para los componentes EIIA y Hpr.

Dada esa información, el único gen anotado con cierta similitud a los *hprK* era aquel codificante para “HprK_rel_A”, es decir, una quinasa A similar a las proteínas HprK. Teniendo esto en cuenta, se construyó un mutante de delección interna en fase (estirpe MPO809) en dicho gen.

Para la construcción de este mutante se empleó el plásmido pMPO1132, construido sobre el vector suicida pEX18tc, que portaba de forma contigua la región flanqueante aguas arriba (800 pb) y la correspondiente aguas abajo (761 pb) de *hprK_rel_A*. El doble evento de recombinación homóloga gracias a dichos fragmentos, daría lugar a una delección en fase de la mayoría del gen 2137. El plásmido pMPO1132 se introdujo en TFA mediante conjugación. Tras la selección del doble evento de recombinación, se obtuvo el mutante MPO809, cuya estructura génica (comprobada por Southern Blot- no mostrado-) está esquematizada en la figura 44.

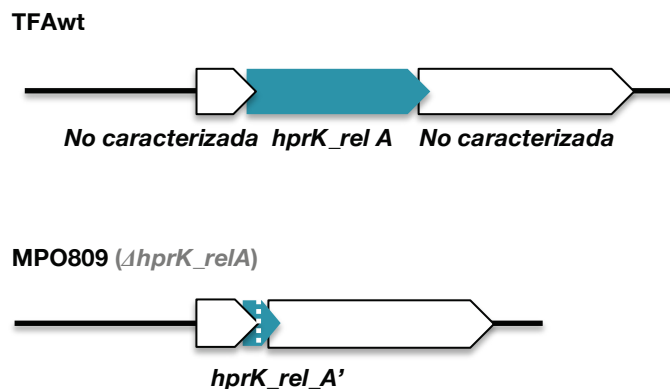


FIG. 44. Representación de *hprK_relA* (gen 2137) en TFA silvestre y en el mutante $\Delta hprK_relA$ (MPO809). En el mutante se mantienen en fase 75 pb de la secuencia original de *hprK_relA* (18 del inicio y 57 del final del gen, interrumpidas por una diana BamHI)

La caracterización de la estirpe mutante MPO809 se inició con el análisis de su capacidad de crecimiento en aquellas fuentes de carbono habitualmente empleadas para TFA. Para ello, se hizo un seguimiento del crecimiento, en paralelo a TFA silvestre, en

medio mínimo suplementado con tetralina o β -HB, en las mismas condiciones descritas anteriormente para los mutantes en los genes *cbs* y *fixL*, *fixJ*.

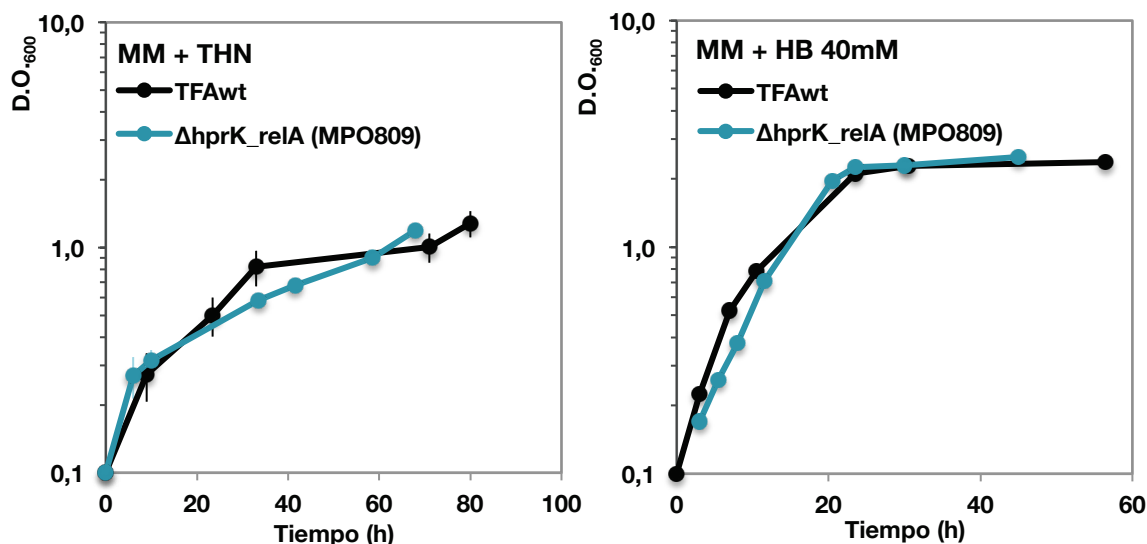


FIG. 45. Crecimiento de TFA y del mutante $\Delta hprK_relA$ (MPO809) en MM con tetralina o β -HB. A. Crecimiento en MM + tetralina (cultivos inoculados con células crecidas en MM+tetralina+ β -HB 8 mM) B. Crecimiento en MM+ β -HB 40 mM (cultivos inoculados con células crecidas en MM+ β -HB 40 mM).

Como puede observarse en la figura 45, el crecimiento de la estirpe $\Delta hprK_relA$ (MPO809) fue idéntico al de TFA silvestre en las dos fuentes de carbono, calculándose en ambos casos tiempos de generación de unas 12 horas para el crecimiento en tetralina y 4 horas en β -HB 40 mM.

Además del crecimiento, se analizó la capacidad de inducción de los genes *thn* siguiendo el mismo procedimiento ya descrito para el mutante de delección del gen *Cbs* (MPO816): se registró el nivel de actividad β -galactosidasa a lo largo del tiempo tras transferir los cultivos de MPO809 de la condición de no inducción a medios en condiciones de represión catabólica o inducción.

Para los ensayos, se integró en el cromosoma de la estirpe MPO809 una fusión traduccional del gen *thnC* y otra del gen *thnB* al gen *lacZ*, dando lugar a las estirpes MPO817 y MPO818, respectivamente. Para la integración de estas fusiones en el genoma de MPO809 de nuevo se emplearon los plásmidos pIZ1002 y pIZ1003.

El comportamiento del mutante se comparó con el de TFA y el de la estirpe afectada en la acumulación de PHA, MPO209, que portaban a su vez las mismas fusiones génicas integradas en el genoma (TFA-1002, TFA-1003 y MPO209-1002). En las figuras 46 y 47 se muestra el crecimiento de estas estirpes y la expresión de cada fusión medida como actividad β -galactosidasa.

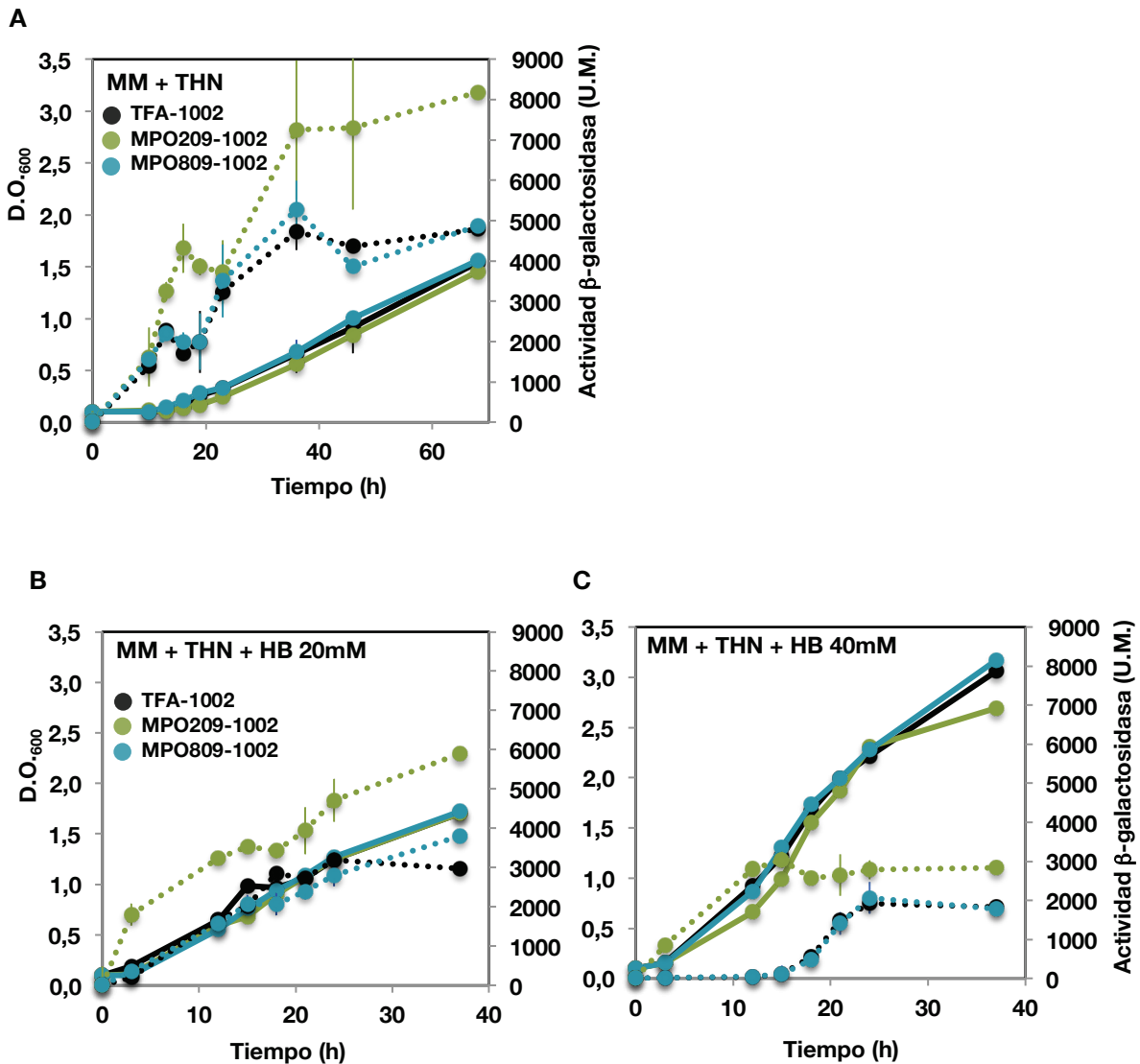


FIG. 46. Curvas de crecimiento y expresión de la fusión *thnC::lacZ* en TFA (TFA-1002), en MPO209 (MPO209-1002) y en el mutante MPO817 (MPO809-1002). Se representa el crecimiento en línea continua y el nivel de expresión *thnC* en línea discontinua. A. Ensayos en MM + THN; B. Ensayos en MM + THN + β -HB 20 mM, C. Ensayos en MM + THN + β -HB 40 mM. Todas las curvas de crecimiento e inducción se iniciaron a partir de pre-cultivos en MM + β -HB 40 mM.

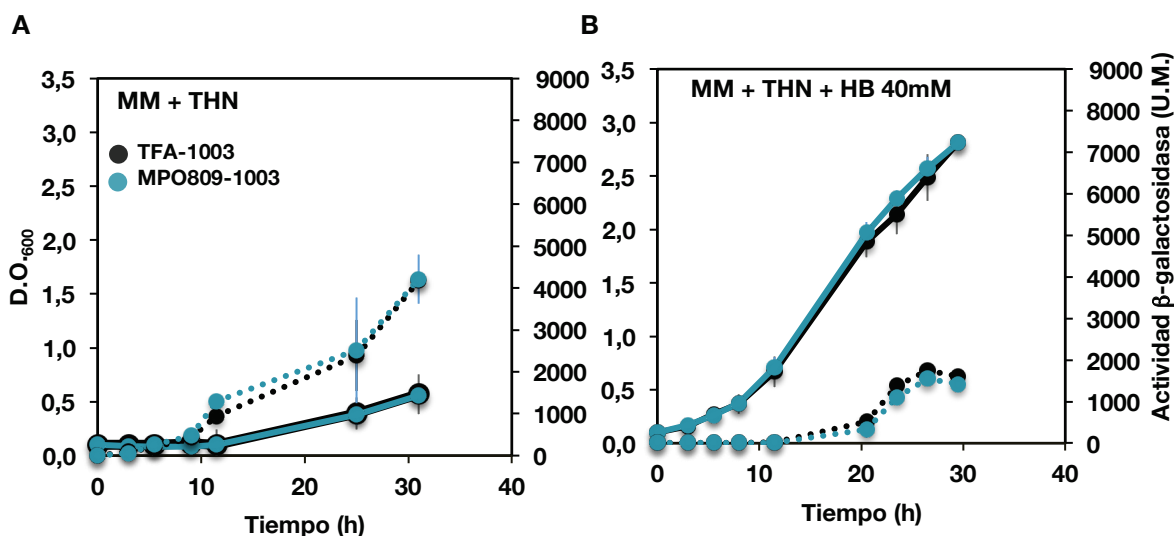


FIG. 47. Curvas de crecimiento y expresión de la fusión *thnB::lacZ* en TFA (TFA-1003) y en el mutante MPO818 (MPO809-1003). Se representa el crecimiento en línea continua y el nivel de expresión *thnC* en línea discontinua. A. Ensayos en MM + THN; B. Ensayos en MM + THN + β-HB 20 mM, C. Ensayos en MM + THN + β-HB 40 mM. Todas las curvas de crecimiento e inducción se iniciaron a partir de pre-cultivos en MM + β-HB 40 mM.

Como puede observarse en las gráficas de las figuras 46 y 47, la capacidad de inducción *thn* del mutante de delección en *hprK_relA* resultó no estar afectada en ninguna de las condiciones, registrándose unos niveles de expresión idénticos a los de TFA silvestre en los cultivos de tetralina que simultaneaban o no la presencia de β-HB.

El mutante MPO209 mostró el fenotipo esperado de adelanto de la expresión *thn*, que ya se aprecia a concentraciones intermedias de β-HB 20 mM (Fig. 46B), pero que es claramente evidente en el caso de mayor nivel de represión, donde se observa que MPO209-1002 llega al máximo de su expresión tras 14 de inducción cuando la estirpe silvestre y el mutante *hprK_relA* no habían aún iniciado la inducción (Figura 46C). Además, se obtuvieron unos niveles finales de expresión *thn* mayores a los de TFA silvestre en todos los casos analizados (figuras 46 A-C).

Finalmente, con el objetivo de analizar la capacidad de represión catabólica del mutante $\Delta hprK_relA$ (MPO809), se midió la expresión de los genes *thnB* y *thnR* mediante RT-qPCR tras la aplicación del estímulo de represión catabólica a cultivos crecidos en tetralina hasta fase exponencial, de manera similar a lo ya descrito para el mutante MPO816. Se tomaron muestras tras 3, 6, 9, 60, 180 y 300 minutos de la adición de β-HB 40 mM al medio. En la figura 48 se muestra el porcentaje de expresión de los genes *thnB* (A) y *thnR* (R) en cada tiempo respecto a la expresión antes de la adición de β-HB 40 mM.

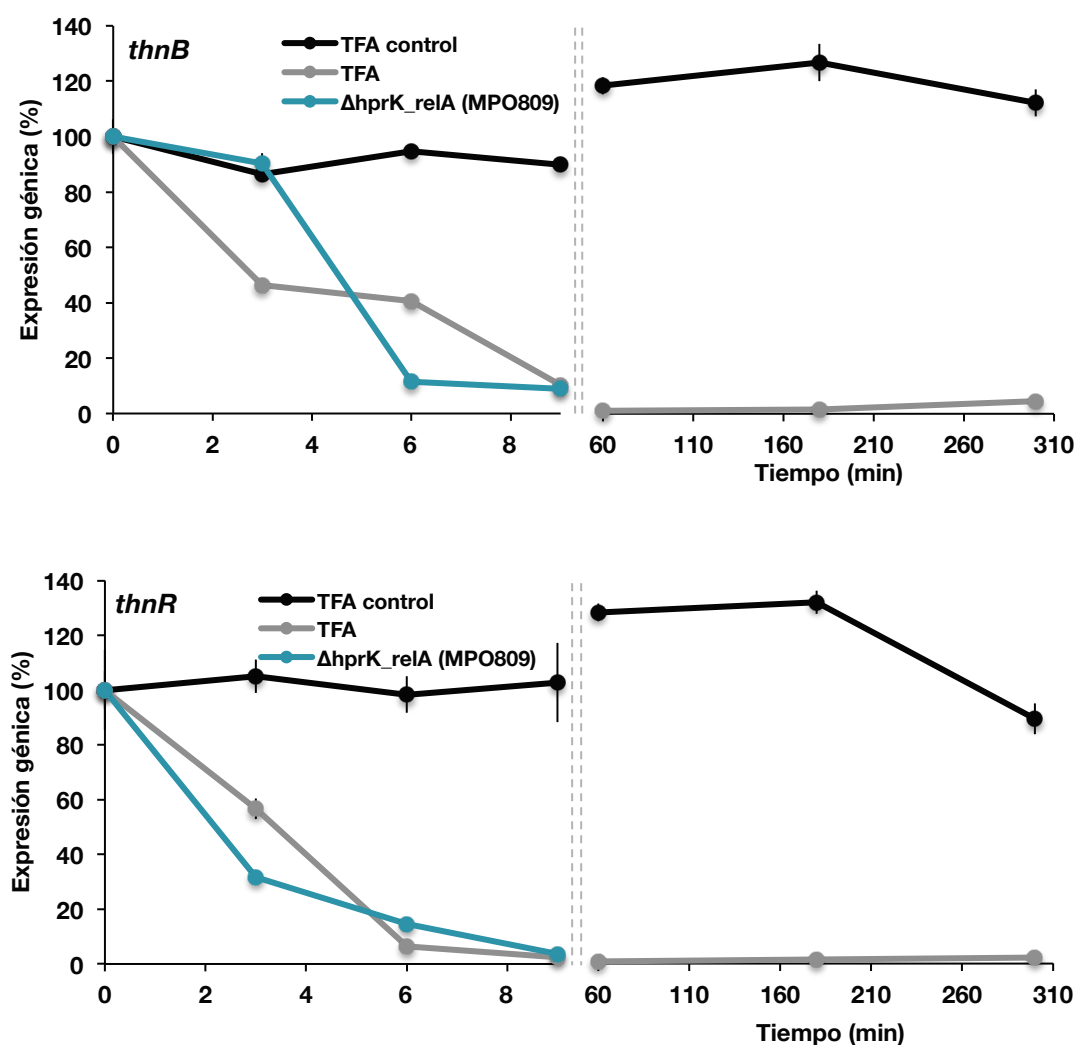


FIG. 48. Expresión de los genes *thnB* y *thnR* tras el estímulo de represión catabólica en TFA y en el mutante MPO809. La cantidad de transcrito en cada muestra se midió mediante RT-qPCR utilizando 10 ng de cDNA de cada muestra. Se realizó una cuantificación absoluta frente a una recta patrón realizada con DNA genómico. El nivel de expresión está indicado como porcentaje del observado en el tiempo cero, justo antes del estímulo de represión catabólica. Se midieron 2 réplicas biológicas.

Como puede apreciarse en la figura 48, el fenómeno de represión catabólica no parece estar alterado en MPO809, ya que la expresión de los genes desciende rápidamente tras la adición de β -hidroxibutirato, tal y como ocurre en TFA en las mismas condiciones.

El total de los resultados confirman que el gen *hprK_relA* no está implicado ni en la represión ni en la inducción de los genes de degradación de tetralina.

4.2.2. Construcción y caracterización de un mutante carente de HprK en TFA

Tras las correcciones en la anotación del genoma de TFA, un segundo gen *hprK* (locus 3852) fue identificado junto a los ya conocidos para Hpr y EIIA. Puesto que este gen sí presentaba una gran similitud con el correspondiente de *S. meliloti*, se decidió entonces construir un segundo mutante de delección interna en fase (y marcado con resistencias a kanamicina y gentamicina) en este nuevo gen *hprK*. Aunque remota, cabía la posibilidad de que el gen *hprK_relA* ya mutado con anterioridad (y sin fenotipo aparente en represión catabólica) pudiera suplir de alguna manera la función de este nuevo *hprK*. En consecuencia, la delección del HPrK codificado por el gen 3852 se llevó a cabo sobre la estirpe MPO809 que ya carecía del gen *hprK_relA*.

Para la construcción de este mutante se empleó el plásmido pMPO1148, construido sobre el vector suicida pEX18tc. Este plásmido contiene, de forma contigua, 2 regiones de del cromosoma de TFA que flanquean al gen *hprK* aguas arriba (1280 pb) y aguas abajo (1494). Al final de la región flanqueante aguas arriba se clonaron también los genes de resistencia a gentamicina y a kanamicina. El doble evento de recombinación homóloga daría lugar a la delección interna en fase de 387 nucleótidos del gen *hprK* acompañada de una inserción de los genes de resistencia a gentamicina y a kanamicina en la intergénica aguas arriba. El plásmido pMPO1148 se introdujo en TFA mediante conjugación. Tras la selección del doble evento de recombinación se obtuvo el mutante MPO824, cuya estructura génica, esquematizada en la figura 49, se comprobó por Southern Blot (no mostrado).

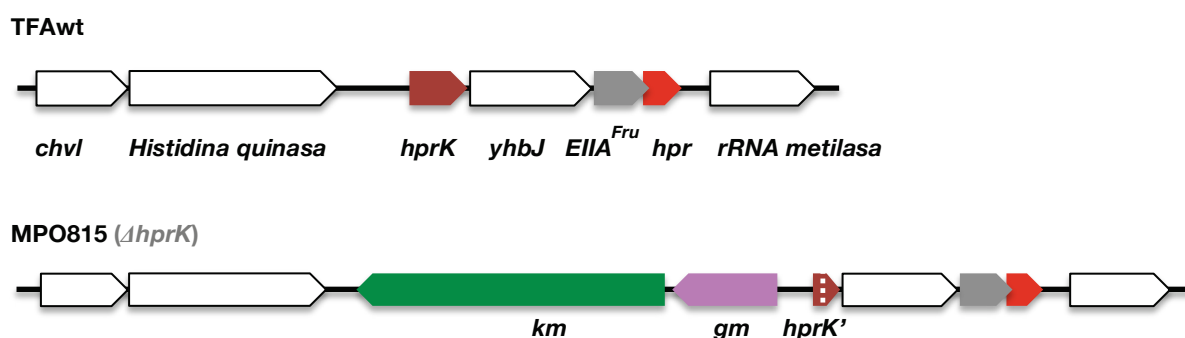


FIG. 49. Representación de *hprK* en TFA silvestre y en el mutante $\Delta hprK$ (MPO824). En el mutante se mantienen en fase 42 pb de la secuencia original de *hprK* (15 del inicio y 27 del final del gen, interrumpidas por una diana HindIII). Las resistencias a kanamicina y gentamicina quedan insertadas aguas arriba.

Al igual que en el caso del mutante MPO809, la caracterización de MPO824 se inició con la caracterización del crecimiento a expensas de tetralina o β -HB. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 50.

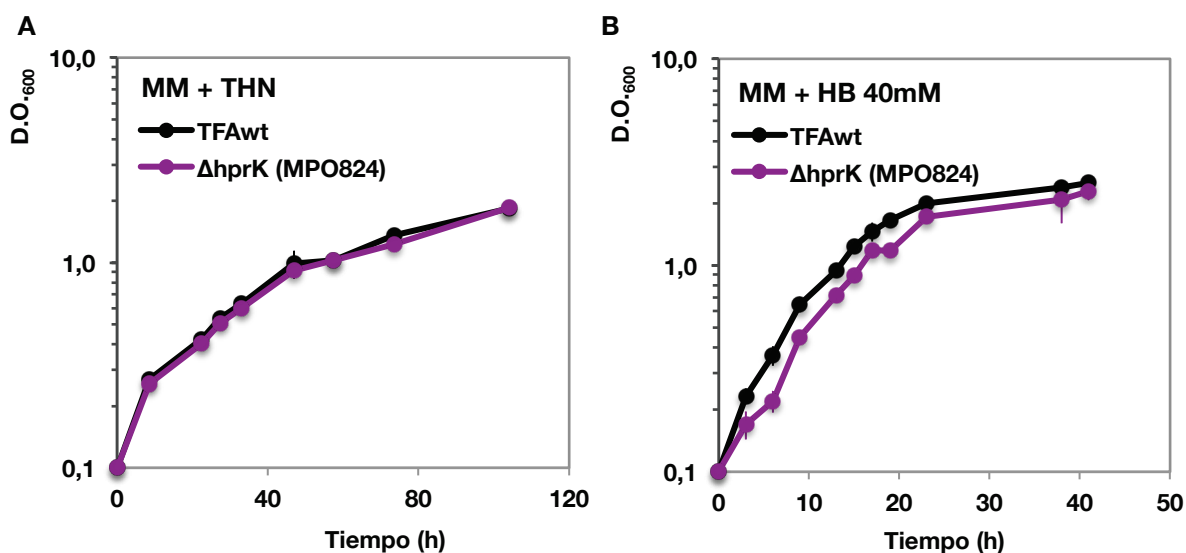


FIG. 50. Crecimiento de TFA y del mutante $\Delta hprK$ (MPO824) en MM con tetralina o β -HB. A. Crecimiento en MM+tetralina (inoculados desde MM+tetralina+ β -HB 8mM) B. Crecimiento en MM+ β -HB 40 mM (inoculados desde MM+ β -HB 40mM)

Durante el crecimiento en tetralina, el mutante MPO824 presentó un crecimiento idéntico al de TFA silvestre. Sin embargo, el crecimiento a expensas de β -HB, que es generalmente muy reproducible, exhibió una ligera diferencia. A pesar de que el tiempo de generación calculado para ambas estirpes en fase exponencial fue idéntico (4,5 horas), la estirpe mutante apenas creció durante las 6 primeras horas, mostrando algo parecido a una fase de latencia.

Para analizar el nivel de inducción de los genes *thn* a lo largo del tiempo, nuevamente se midió la expresión de la fusión *thnC::lacZ* al transferir los cultivos de MPO824 de la condición de no inducción (MM con β -HB 40 mM) a medios con tetralina y distinta concentración de β -HB o con tetralina solamente.

Para los ensayos (Fig. 51) se insertó en el cromosoma de MPO824 la fusión traduccional del gen *thnC* al gen *lacZ*, por integración del plásmido pIZ1002, dando lugar a la estirpe MPO825. El comportamiento del mutante se comparó con el de TFA silvestre portando la misma fusión génica integrada en el genoma (TFA-1002).

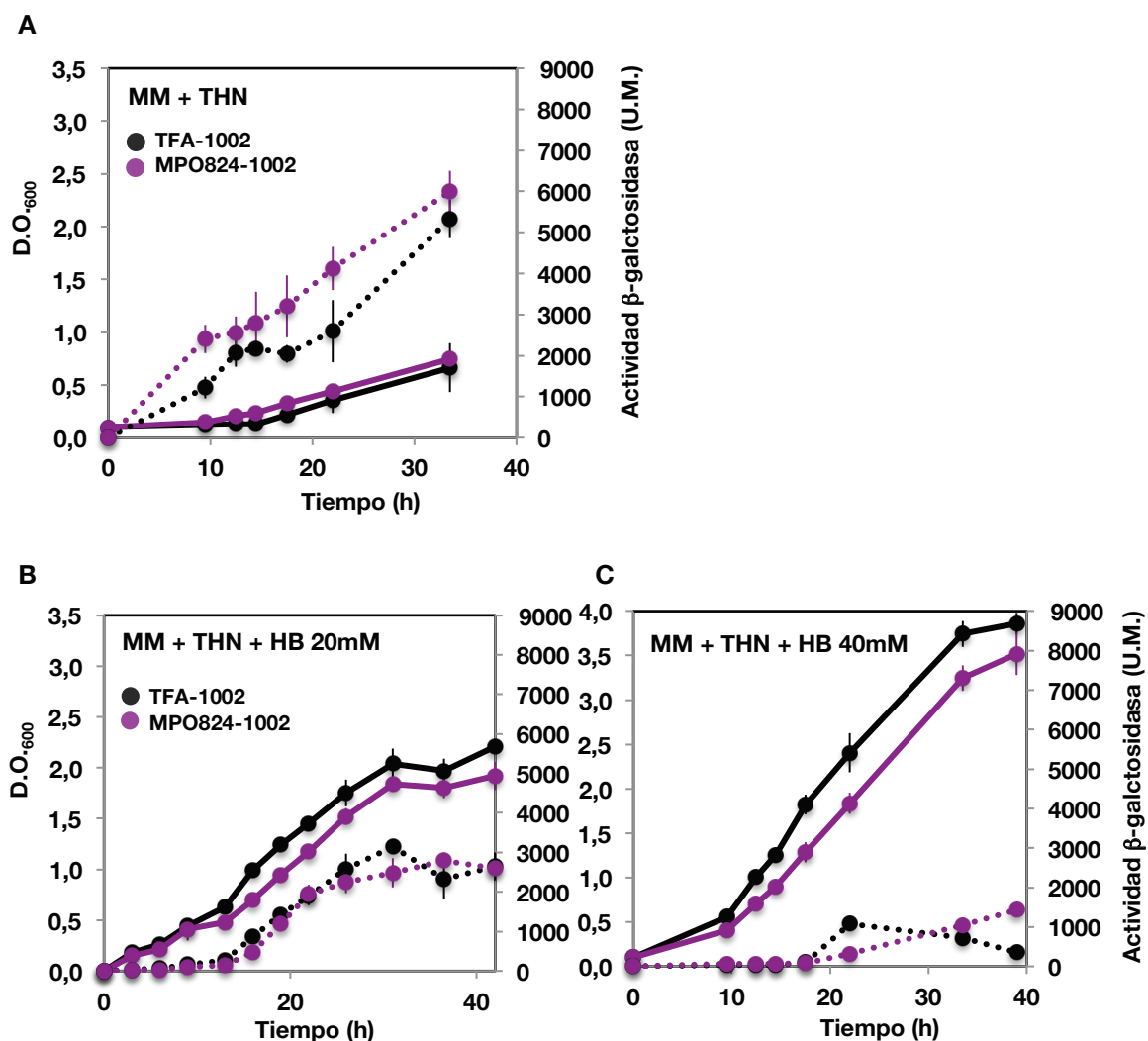


FIG. 51. Curvas de crecimiento y expresión de la fusión *thnC::lacZ* en TFA (TFA-1002) y en el mutante MPO825 (MPO824-1002). Se representa el crecimiento en línea continua y el nivel de expresión *thnC* en línea discontinua. A. Ensayos en MM+THN; B. Ensayos en MM+THN+β-HB 40 mM. Todas las curvas de crecimiento e inducción se iniciaron a partir de pre-inóculos en MM+β-HB 40 mM.

A diferencia de lo observado en las curvas de crecimiento en tetralina (Fig. 50A), donde no se observan diferencias con TFA, el crecimiento del mutante MPO825 en la misma condición, presentó una fase de latencia menor (9,5 h) de lo característico para TFA silvestre (13-14 h) cuando los cultivos eran inoculados, en este caso, desde otros crecidos en MM + β-HB 40 mM (Fig. 51A). Paralelamente, se produce, además, una inducción ligeramente mayor de los genes *thn* en comparación con el silvestre.

En las condiciones de represión catabólica (Fig. 51B-C), el crecimiento del mutante está ligeramente retardado con respecto al de TFA (como se aprecia en las curvas de

crecimiento en β -HB 40 mM, Fig. 51B) y la expresión del gen *thnC* parece también inducirse algo más tarde en presencia de β -HB 40 mM.

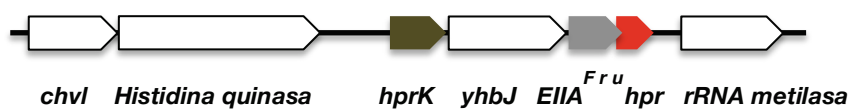
No obstante, las diferencias observadas en el mutante MPO825 con respecto al crecimiento (fase de latencia acortada en tetralina cuando los cultivos provienen de β -HB 40 mM o crecimiento inicial ligeramente retardado durante el crecimiento en β -HB 40 mM) y con respecto a la expresión de *thnC::lacZ* (algo superior durante el crecimiento en tetralina y ligeramente tardía en condiciones de represión catabólica) son tan sutiles que no pudo confirmarse con estos análisis que el gen *hprk* estuviera realmente implicado en la inducción o represión de los genes *thn*.

4.2.3. Construcción y caracterización de un mutante carente de Hpr en TFA

El mutante MPO815 se obtuvo tras un doble evento de recombinación del plásmido pMPO1146 (construido sobre el vector suicida pEX18tc) con el cromosoma de TFA dando lugar a la delección de *hpr* y su sustitución por el gen de resistencia a kanamicina. Para no afectar a la expresión del gen codificante de EIIA situado aguas arriba y cuyo codón de parada solapa con el de inicio de *hpr*, se mantuvieron los 7 primeros codones del gen delecionado en la estructura génica final del mutante MPO815.

El plásmido pMPO1146 se introdujo en TFA por conjugación. La estructura génica del mutante MPO815 (Fig 52) se confirmó por Southern Blot (no mostrado).

TFAwt



MPO815 (Δhpr)

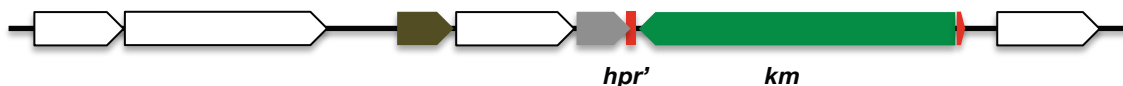


FIG. 52. Representación de la organización génica en TFA y en el mutante Δhpr (MPO815). Se indica en rojo el gen *hpr* y su entorno génico. El codón de stop del gen que codifica la proteína EIIA^{Fru} solapa con el de inicio de *hpr*. En el mutante MPO815, el gen *hpr* está sustituido por un gen de resistencia a kanamicina; tan sólo se mantienen los 7 primeros codones y el codón de stop de la secuencia original de *hpr*.

La caracterización de la estirpe mutante MPO815 se inició con el análisis de su capacidad de crecimiento, analizada en este caso en tetralina, β -HB, o ambas a la vez, y en distintas concentraciones.

Para las curvas de crecimiento en MM con tetralina, los cultivos se iniciaron a una D.O.₆₀₀ de 0,1 a partir de otros crecidos hasta D.O.₆₀₀ de 0,8 en MM con tetralina y β -HB 8 mM o bien en MM + β -HB 40 mM solo.

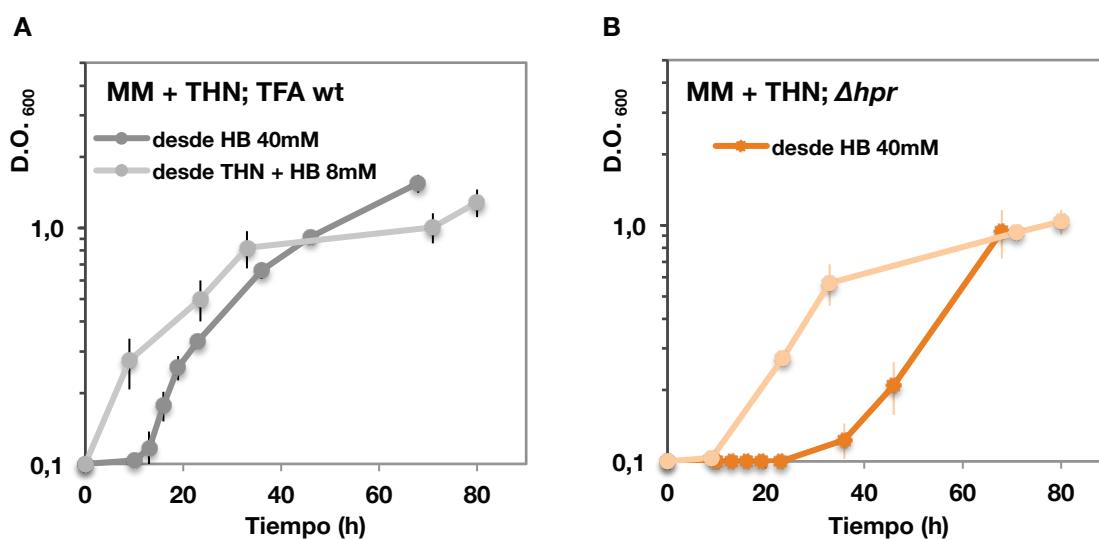


FIG. 53. Crecimiento de TFA y del mutante Δhpr (MPO815) de en MM con tetralina. A. Crecimiento de TFA silvestre, B. Crecimiento de Δhpr (MPO815). Se muestra el crecimiento de los cultivos inoculados con células crecidas en MM+THN+ β -HB 8 mM o en β -HB 40 mM.

En el medio con tetralina (Fig. 53B), el mutante creció con el mismo tiempo de generación que TFA en fase exponencial, pero presentó una fase de latencia algo superior a lo habitual (de un mínimo de 9 horas). Dicha fase de latencia era mucho mayor (36 horas) en el caso de que los cultivos en tetralina se inocularan con células procedentes de cultivos crecidos en MM con β -HB 40 mM.

Por otro lado, se realizaron curvas de crecimiento en MM con β -HB 40 mM, MM con tetralina+ β -HB 8 mM y MM con tetralina+ β -HB 40 mM. Todas ellas se iniciaron a una D.O.₆₀₀ de 0,1 a partir de cultivos que provenían de MM+ β -HB 40 mM, a D.O.₆₀₀ de 0,8. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 54.

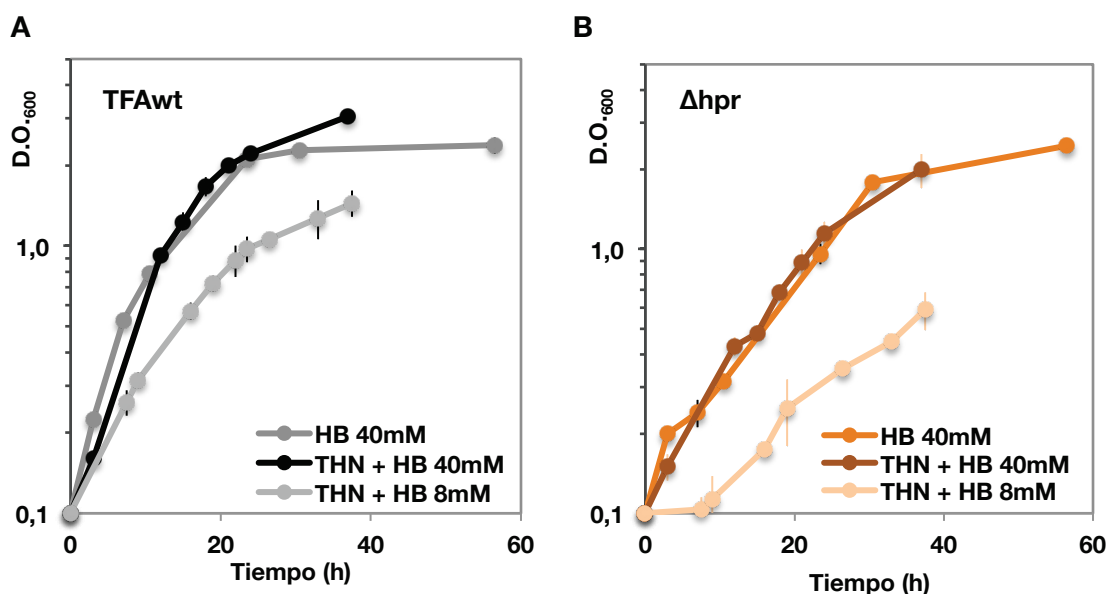


FIG. 54. Crecimiento de TFA y del mutante Δhpr (MPO815) en MM con β -HB 40 mM, MM+tetralina+ β -HB 8 mM o MM+tetralina+ β -HB 40 mM. A. Crecimiento de TFA silvestre, B. Crecimiento de Δhpr (MPO815). Se usaron preinóculos crecidos en MM+ β -HB 40 mM para todos los casos.

Como puede observarse en la figura 54B, la estirpe Δhpr (MPO815) presentó un crecimiento más lento en β -HB 40 mM en comparación con el de TFA silvestre. El tiempo de generación calculado para este mutante en MM+ β -HB 40 mM fue de 8,4 horas, siendo el de TFA de 4 horas en este mismo medio.

En el caso del crecimiento en MM con tetralina y β -HB 40 mM, el mutante MPO815, exhibió un crecimiento característico del uso exclusivo de β -HB 40 mM, registrándose de nuevo un tiempo de generación de 8,4 h para esta condición. En la condición de tetralina+ β -HB 8 mM, TFA presenta un tiempo de generación en fase exponencial más corto que el característico para el crecimiento a expensas únicamente de tetralina (de 7,2 h frente a $12,5 \pm 2$ h) y un crecimiento en unidades de D.O.₆₀₀ por encima del que alcanzaría creciendo en un medio suplementado únicamente con β -HB 8 mM (donde alcanza un máximo de 0,4 de D.O.₆₀₀). En el mutante MPO815, sin embargo, el tiempo de generación calculado en la condición de MM con tetralina y β -HB 8 mM (12,5 h) fue similar al calculado en MM con tetralina, indicando nuevamente que el crecimiento a expensas de β -HB está ralentizado en este mutante.

Finalmente, dado el fenotipo de crecimiento del mutante MPO815 a expensas de β -HB, se quiso analizar si el crecimiento en otras fuentes de carbono estaría afectado de la misma manera. Para ello, se realizaron curvas de crecimiento en medio rico MML y en MM suplementado con ácido sebácico 15,9 mM (concentración que suministra al medio exactamente el mismo número de átomos de carbono que el β -HB en concentración 40 mM), inoculando los cultivos a partir de pre- inóculos en el mismo medio a testar (MML o MM con sebácico 15,9 mM).

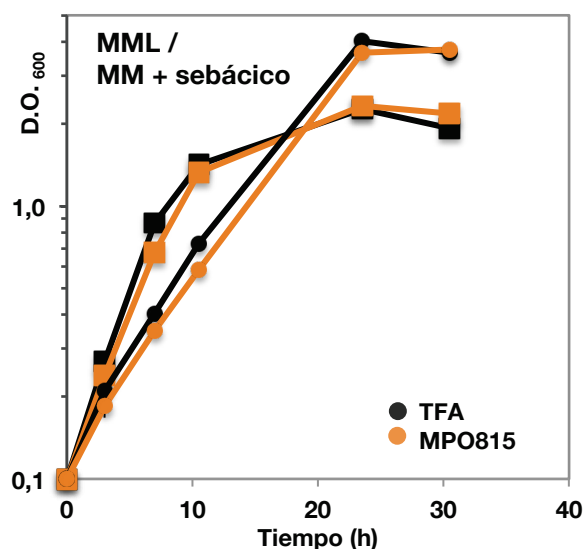


FIG. 55. Crecimiento de TFA y del mutante Δhpr (MPO815) en MML o MM con ácido sebácico. Se representa el crecimiento en MM + ácido sebácico 15,9 mM (●) o en MML (■). En línea negra TFA y en línea naranja el mutante MPO815. Cada curva de crecimiento se inició desde cultivos iguales a los que se inoculaban.

A la vista de los resultados (Fig. 55) pudo concluirse que el crecimiento en medio rico o en presencia del ácido sebácico no estaba afectado en absoluto y que los tiempos de generación en estos medios eran idénticos a los registrados para TFA (2,6 y 4,6 horas, respectivamente).

En la siguiente tabla se especifican los tiempos de generación calculados en los distintos medios de cultivo y para cada estirpe.

	TFA silvestre	<i>Δhpr</i> (MPO815)
Tetralina	12,5	12,5
β-HB 40mM	4	8,4
Tetralina + β-HB 8 mM	7,2	12,5
Tetralina + β-HB 40 mM	4	8,4
Ác. sebácico 15,9 M	4,6	4,6
MML	2,6	2,6

Tabla 15. Tiempos de generación de TFA silvestre y de MPO815 en los distintos medios analizados.
Expresado en horas.

Ante la posibilidad de que el inusual fenotipo de crecimiento del mutante MPO815 en β-HB estuviera causado por alguna deficiencia en el metabolismo de este ácido carboxílico, se analizó la expresión del gen 3399 de TFA que codifica para la subunidad A de la enzima 3-oxoácido-CoA transferasa (una de las enzimas implicadas en el metabolismo del β-HB en otras bacterias). Los datos previos obtenidos en los experimentos de proteómica indican que la expresión de esta proteína se ve inmediatamente incrementada tras la adición de β-HB 40 mM a los cultivos crecidos en tetralina. Se quiso comprobar si, a nivel transcriptómico, la expresión de la 3-oxoácido-CoA transferasa en el mutante MPO815 se encontraba afectada.

Para ello, se midió mediante RT-qPCR a tiempo real, la expresión del gen 3399 en cultivos crecidos hasta fase exponencial en MM con tetralina (tiempo 0) y tras 3, 6, 9, 60 y 180 minutos tras la adición de β-HB 40 mM al mismo medio.

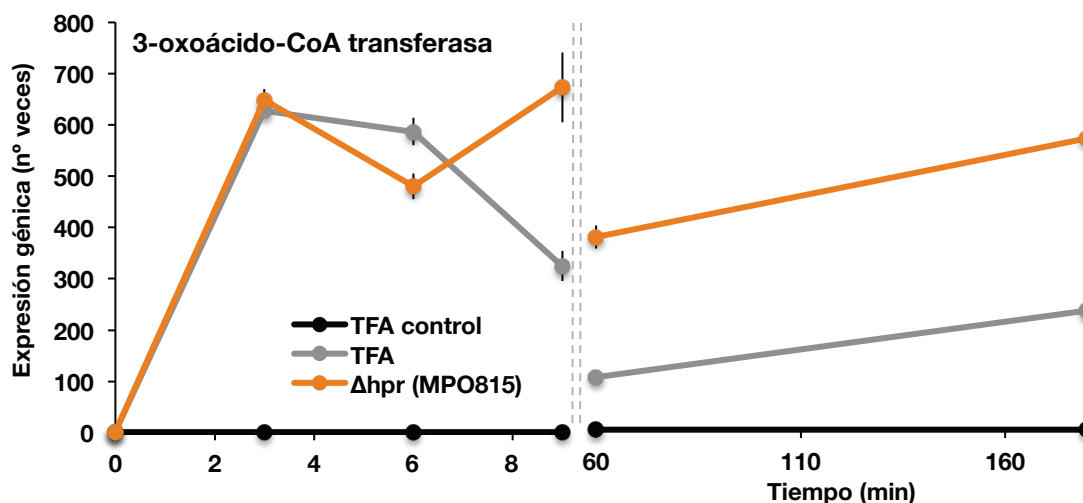


FIG. 56. Expresión del gen codificante de la subunidad α de la 3-oxoácido-CoA transferasa tras el estímulo de represión catabólica en TFA silvestre y en el mutante MPO815. La cantidad de transcrito en cada muestra se midió mediante RT-qPCR utilizando 10 ng de cDNA de cada muestra. Se realizó una cuantificación absoluta frente a una recta patrón realizada con DNA genómico. El nivel de expresión está indicado como número de veces de inducción con respecto a lo observado en el tiempo cero, justo antes del estímulo de represión catabólica.

Como puede observarse en la figura 56, la expresión de esta enzima se induce rápidamente tras la adición de β -HB tanto en TFA silvestre como en el mutante Δhpr , manteniéndose más elevada en el mutante a tiempos largos. Se concluyó, por tanto, que era improbable que el mutante estuviera afectado en la inducción de los genes necesarios para el metabolismo del hidroxibutirato.

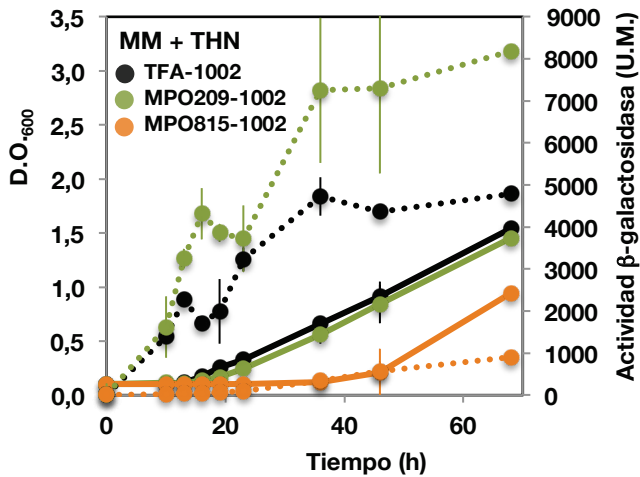
Para analizar el papel de Hpr en la inducción de los genes *thn* se analizó el nivel de expresión de los genes *thn* a lo largo del tiempo al transferir los cultivos de MPO815 de la condición de no inducción (MM con β -HB 40 mM) a condiciones de represión catabólica (MM con tetralina y β -HB 20 ó 40 mM) o condiciones de inducción (MM con tetralina).

Para los ensayos, se emplearon las estirpes MPO819 y MPO820 obtenidas mediante la integración de los plásmidos pIZ1002 (*thnC::lacZ*) y pIZ1003 (*thnB::lacZ*) en la estirpe MPO815.

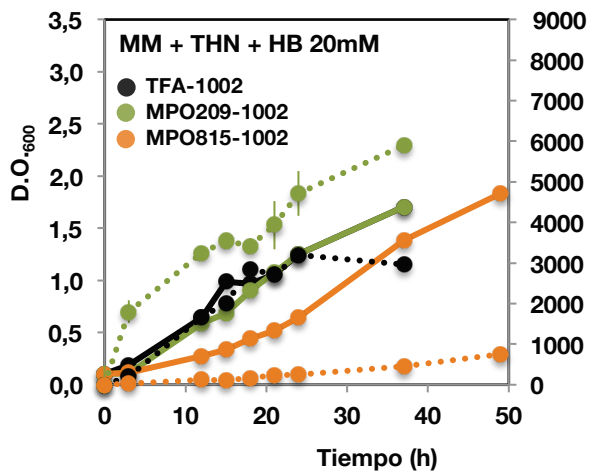
El comportamiento del mutante se comparó con el de TFA silvestre y con el de la estirpe afectada en la acumulación de PHB, MPO209, portando las mismas fusiones

génicas integradas en el genoma (estirpes TFA-1002, TFA-1003 y MPO209-1002 respectivamente). El mutante MPO209 se usó como referencia ante la posibilidad de que la estirpe MPO815 estuviera afectada en el mismo sentido.

A



B



C

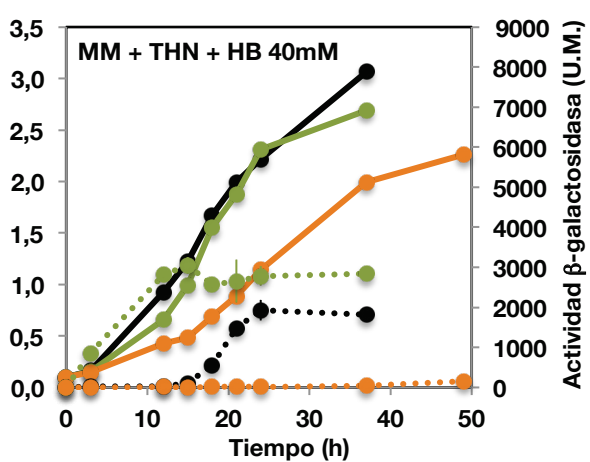


FIG. 57. Curvas de crecimiento y expresión de la fusión *thnC::lacZ* en TFA (TFA-1002), en MPO209 (MPO209-1002) y en el mutante MPO819 (MPO815-1002). Se representa el crecimiento en línea continua y el nivel de expresión *thnC* en línea discontinua. A. Crecimiento en MM+THN; B. Crecimiento en MM+tetralina+β-HB 20 mM, C. Crecimiento en MM+tetralina+β-HB 40 mM. Todas las curvas de crecimiento e inducción se iniciaron a partir de pre-cultivos en MM+β-HB 40 mM.

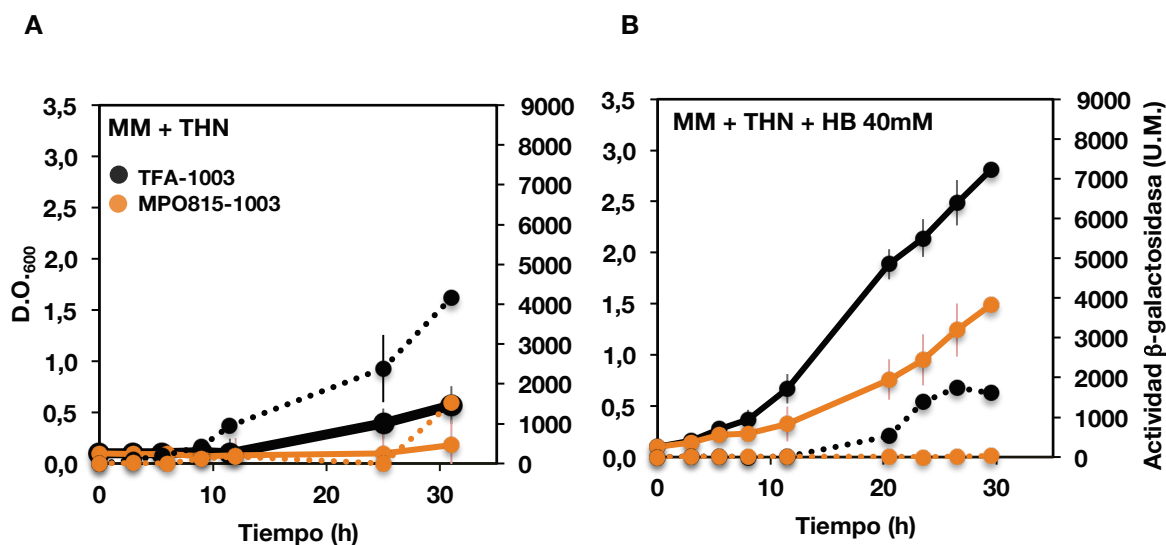


FIG. 58. Curvas de crecimiento y expresión de la fusión *thnB::lacZ* en TFA (TFA-1003) y en el mutante MPO820 (MPO815-1003). Se representa el crecimiento en línea continua y el nivel de expresión *thnB* en línea discontinua. A. Crecimiento en MM+tetralina; B. Crecimiento en MM+tetralina+β-HB 40 mM. Todas las curvas de crecimiento e inducción se iniciaron a partir de pre- cultivos en MM+β-HB 40 mM.

Como puede observarse en las gráficas de la figuras 57 y 58, la capacidad de inducción *thn* del mutante Δhpr se vio seriamente afectada en todos los casos. Se registraron unos niveles de expresión de los genes *thn* muy bajos cuando la estirpe era cultivada en presencia de tetralina como única fuente de carbono, alcanzándose un máximo de 900 U.M. para la fusión *thnC::lacZ* al cabo de 68 h (Fig. 57A). En comparación, TFA silvestre superó esos niveles de inducción al cabo de 6 h en presencia del mismo medio de cultivo, alcanzando valores máximos de 5000 U.M para esta fusión. En el caso de la expresión del gen *thnB*, el efecto observado fue el mismo (Fig. 58). La incorrecta inducción de los genes *thn* en el mutante debe ser, por tanto, responsable de su larguísima fase de latencia al iniciar el crecimiento a expensas de tetralina.

Resultó llamativo que la estirpe Δhpr consiguiera alcanzar un crecimiento de 1 unidad de D.O.₆₀₀ en tetralina a pesar de presentar en ese momento unos niveles de expresión de los genes *thn* reducidos a la mitad (900 U.M.) con respecto a lo observado a esa D.O.₆₀₀ para TFA silvestre (2000 U.M., aproximadamente) (Fig. 57A).

En la condición de represión catabólica (medio mínimo con tetralina y β-HB 40 mM, simultáneamente), la expresión de los genes de degradación de tetralina en el mutante se vio silenciada durante más tiempo en comparación con TFA (Figuras 57BC y 58B). La

expresión en el mutante Δhpr se mantuvo en 150 U.M para la fusión $thnC::lacZ$ y en 35 U.M. para la fusión $thnB::lacZ$ hasta el tiempo máximo analizado (50 horas). En comparación, TFA silvestre comenzó a inducir los genes *thn* a partir de las 15 h hasta alcanzar un nivel máximo de 2000 U.M.

El mutante MPO209, que se empleó de referencia, presentó los patrones de crecimiento e inducción génica esperados en todas las condiciones.

Para el estudio de represión catabólica en la estirpe MPO815, se analizó de nuevo, mediante RT-qPCR, la expresión de los genes *thnB* y *thnR* antes (tiempo 0) y después (3, 6, 9, 60, 180 y 300 minutos) de la adición de β -HB a una concentración final de 40 mM. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la figura 59.

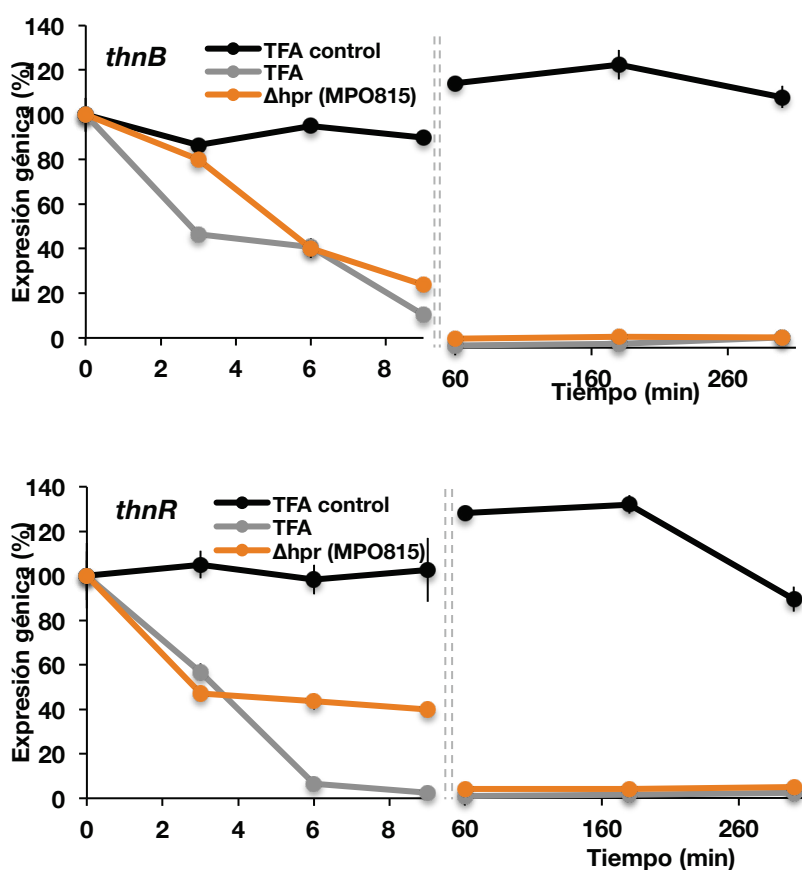


FIG. 59. Expresión de los genes *thnB* y *thnR* tras el estímulo de represión catabólica en TFA silvestre y en el mutante MPO815. La cantidad de transcrito en cada muestra se midió mediante RT-qPCR utilizando 10 ng de cDNA de cada muestra. Se realizó una cuantificación absoluta frente a una recta patrón realizada con DNA genómico. El nivel de expresión está indicado como porcentaje del observado en el tiempo cero, justo antes del estímulo de represión catabólica. Se midieron 2 réplicas biológicas.

Este análisis de expresión de los genes *thn* puso de manifiesto que el mutante responde a la presencia de la fuente de carbono preferencial del mismo modo que TFA, disminuyendo la expresión de los genes *thn*. Además, los genes *thn* se mantienen reprimidos a lo largo del tiempo, lo que confirma que Hpr no está implicada en el fenómeno de represión catabólica en TFA.

A la vista de los resultados de los experimentos de RT-qPCR y de los ensayos β -galactosidasa, puedo concluirse que el mutante Δhpr no está afectado en represión de los genes *thn*, pero sí en su inducción.

Existen numerosos casos descritos en bacterias en los que los componentes del sistema “clásico” PEP-PTS o sus parálogos del sistema PTS^{Ntr} guardan una relación evidente con el metabolismo de los polímeros de reserva producidos.

En *Pseudomonas putida*, los mutantes de inserción en *ptsP* o *ptsO* (homólogos a los genes que codifican para EI^{Ntr} y Npr en *E. coli*, respectivamente) acumulan una menor cantidad de polihidroxicanoatos que el silvestre. Por el contrario, los mutantes en *ptsN* (codificante para EI^{Ntr}) manifiestan una acumulación mayor de lo normal del mismo polímero (Velazquez *et al.*, 2007). En otra γ -proteobacteria, *Azotobacter vinelandii*, el efecto de las mutaciones *ptsP*, *ptsO* y *ptsN* sobre la acumulación de PHB es el mismo que en *P. putida* (Noguez *et al.*, 2008)

Dentro de las β -proteobacterias, están descritos los fenotipos de los mutantes en estos genes en *Ralstonia eutropha* y en *Alcaligenes eutrophus*. En *R. eutropha*, los mutantes de delección simple, doble y triple de los genes codificantes para EI, EI^{Man} y Hpr acumulan entre un 10 y un 39 % menos de PHB que el silvestre; mientras que la delección de otro gen codificante para EI^{Mtl} (con una identidad del 29 % con EI^{Ntr} de *E. coli*) genera un incremento de un 11,5 % en la acumulación de PHB (Kaddor *et al.*, 2011). En *A. eutrophus* se ha descrito que los mutantes de inserción en *phbH* y *phbI* (codificantes para proteínas con un 34,5 y un 39,8 % de identidad con respecto a Hpr y EI de *E. coli*) degradan los gránulos de PHB durante la fase estacionaria mucho más rápido que el silvestre (Pries *et al.*, 1991).

Teniendo en cuenta dichas referencias en otras bacterias y dada la baja inducción de los genes *thn* en el mutante Δhpr (MPO815) al ser este transferido de un medio mínimo con β -HB 40 mM (donde la acumulación de PHB debe ser activa) a otro donde el crecimiento sólo es posible a expensas de tetralina, se planteó la posibilidad de que el mutante Δhpr estuviera afectado en el metabolismo de los gránulos de poli-hidroxibutirato.

La relación entre la acumulación de estos polímeros de reserva y la inducción de los genes de degradación de tetralina ya era conocida en *S. macroglutabida* gracias al fenotipo del mutante MPO209, donde la capacidad disminuida de acumulación de PHB conlleva un adelanto de la expresión *thn* en condiciones de represión catabólica con respecto a lo característico de TFA silvestre. Se decidió comprobar si la delección del gen *hpr* en la estirpe MPO815 provoca un incremento en la acumulación del polímero de reserva, impidiendo la inducción de los genes *thn*.

Para analizar esta posibilidad, se comparó la capacidad de producción de PHB en MM con β -HB 40 mM y tetralina a lo largo del tiempo, en TFA, la estirpe MPO209 y la estirpe MPO815 mediante tinción de los gránulos de PHB con el compuesto fluorescente Rojo Nilo. En paralelo, se realizó un conteo de células viables en placas de medio rico MML para poder normalizar la cuantificación de los gránulos según el número de células.

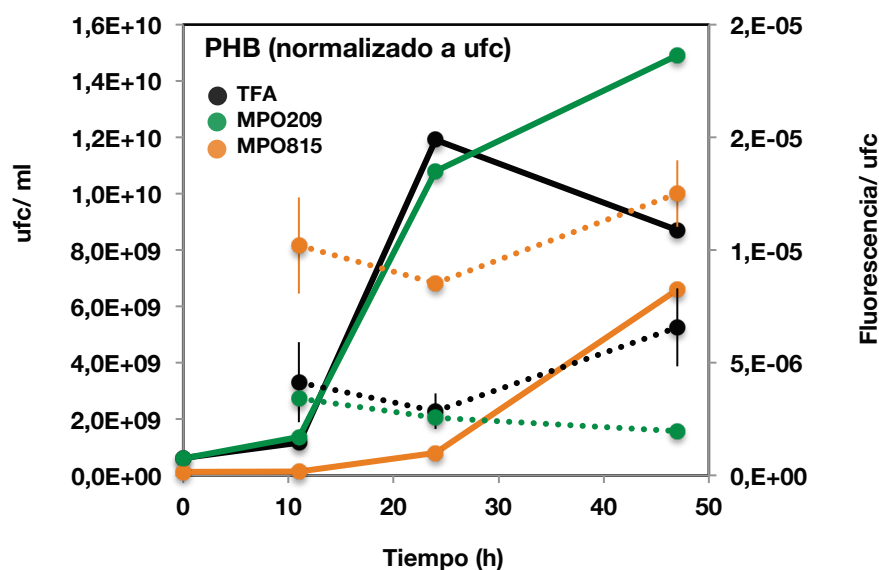


FIG. 60. Producción de gránulos de PHB en TFA silvestre y en los mutantes MPO209 y MPO815 de *S. macroglutabida* TFA. Se representa en línea discontinua el nivel de fluorescencia debido a la tinción con Rojo Congo de los gránulos de PHB) normalizado al número de unidades formadoras de colonia en cada cepa y en línea continua el crecimiento (ufc/ml).

En la figura 60 puede apreciarse cómo la acumulación de gránulos de PHB en la estirpe MPO815 es entre 2 y 3 veces superior a la de TFA silvestre a lo largo del tiempo. La acumulación de PHB en la estirpe MPO209 no difiere de la observada para TFA hasta al menos las 25 horas; posteriormente, a las 47 horas, se aprecia una disminución de al menos 3 veces. En las tres estirpes parece producirse un leve consumo de los gránulos de PHB hasta al menos transcurridas 25 horas, momento tras el cual la acumulación aumenta para MPO815 y TFA, pero no para MPO209.

A la vista de los resultados, pudo concluirse que la estirpe que porta la delección Δhpr acumula, efectivamente, una mayor cantidad de gránulos de poli-hidroxibutirato que TFA silvestre. Esto podría estar alterando las señales moleculares que integran la información sobre los niveles de carbono y nitrógeno disponibles en la célula, dando lugar a una alteración en la inducción de los genes de degradación de tetralina.

DISCUSIÓN

La expresión de los genes *thn* de *S. macroglutabida* TFA para la degradación de tetralina depende de la presencia de dicho compuesto en el medio, de la regulación específica ya descrita (apartado 4.2 de la Introducción de esta Tesis) mediada por ThnR y ThnY, de la modulación ejercida por la dioxigenasa inicial ThnA1A2A3A4 y, en último término, de la presencia de otras fuentes de carbono presentes en el medio que puedan desencadenar el proceso de represión catabólica. A diferencia de otras bacterias, TFA es incapaz de emplear azúcares como pentosas, hexosas (incluida la glucosa) o disacáridos como fuentes de carbono. Tampoco ciertos ácidos mono o dicarboxílicos de cadena corta como piruvato, 2-oxoglutarato o succinato. En su lugar, los compuestos que TFA sí puede metabolizar y que ejercen represión catabólica sobre la ruta de degradación de tetralina son algunos ácidos mono o dicarboxílicos de cadena media- larga como el ácido β -hidroxibutírico (o β -hidroxibutirato), ácido sebácico, ácido mirístico y ácido tetradecanoico. El primero de ellos (ácido carboxílico de cuatro carbonos) es el que se ha empleado comúnmente en TFA para el estudio del fenómeno de represión catabólica.

Durante el desarrollo de esta Tesis se ha intentado analizar en mayor profundidad el mecanismo de represión catabólica en TFA y contribuir al esclarecimiento de su base molecular. Los precedentes con los que se inició esta investigación pusieron de manifiesto que la búsqueda de elementos implicados en represión catabólica mediante mutagénesis exhaustiva y al azar del genoma estaba agotada y, por tanto, no generaría mayor información. En consecuencia, las estrategias desarrolladas en la presente Tesis se han centrado en otras aproximaciones globales (como los experimentos de proteómica) que pudieran ayudar al entendimiento del fenómeno de represión catabólica y en la construcción de mutantes específicos en elementos potencialmente implicados en el mismo proceso.

En adelante, se hace un análisis sobre los resultados obtenidos en el total de aproximaciones llevadas a cabo.

1. Fisiología del fenómeno de represión catabólica en *Sphingopyxis macrogolitabida* TFA

1.1. Análisis del crecimiento y la inducción de los genes *thn* en condiciones de represión catabólica

Como primera aproximación al entendimiento de la represión catabólica en *Sphingopyxis macrogolitabida* TFA se analizó el crecimiento y la evolución de la expresión de los genes *thn* a lo largo del tiempo en medios de cultivo que promovían el desarrollo de este tipo de regulación global (medio mínimo suplementado con tetralina y β -HB o ácido sebácico).

La primera observación que se desprendió del análisis del crecimiento es la ausencia de un crecimiento de tipo diáuxico. La presencia simultánea en el medio de dos fuentes de carbono que, en principio, se metabolizan con distinto nivel de preferencia, los ácidos carboxílicos (β -hidroxibutirato o ácido sebácico) y la tetralina, no genera un patrón claro de crecimiento asociado al uso exclusivo de los ácidos carboxílicos en primer lugar y de la tetralina en último término. Un crecimiento de tipo diáuxico debería generar dos fases de crecimiento diferenciadas, caracterizadas por tiempos de generación distintos, y separadas por una fase de latencia, de menor o mayor longitud, debida a la reprogramación metabólica necesaria (Mahadevan *et al.*, 2002).

En su lugar, TFA mantiene un crecimiento continuo hasta alcanzar una densidad máxima de población de 10^{10} ufc/ml. Los tiempos de generación calculados en los medios en los que se simultanea tetralina y β -HB (en concentraciones de 20 ó 40 mM) parecen corresponder a los del uso exclusivo del ácido carboxílico en la misma concentración (aproximadamente 4 h para β -HB 40 mM y 7 h para β -HB 20 mM), sugiriendo que el uso de tetralina en los cultivos mixtos debe ser prácticamente inexistente durante la mayor parte de la fase exponencial. Sin embargo, la inducción de los genes *thn* para la degradación de tetralina ocurre relativamente pronto (a partir de las 6 o de las 15 horas en presencia de β -HB 20 o 40 mM) y durante esa misma fase en la que el uso de la tetralina parece improbable.

A pesar de que dicha inducción temprana de los genes de degradación de tetralina podría estar reflejando la existencia de un sistema ineficiente, varios estudios sugieren que el nivel de ajuste de los procesos de regulación y de los flujos metabólicos supone una adaptación al tipo de ambiente en el que la población de células se desarrolla (New *et al.*, 188

2014, Schuetz *et al.*, 2012). Así, las poblaciones bacterianas se enfrentan a un balance de beneficio-perjuicio en cuanto a desarrollar estrategias más especialistas o más generalistas según los medios sean estables o cambiantes en términos de disponibilidad de las fuentes de carbono (una y constante, o varias de ellas que se alternan en el tiempo). En el caso de TFA, puede que la inducción de los genes de degradación de tetralina en una fase en que la bacteria aún emplea β -HB como fuente de carbono sea reflejo de una adaptación evolutiva a su ambiente natural. En este sentido, un estudio desarrollado en levaduras (New *et al.*, 2014) pone de manifiesto que la adaptación a los medios cambiantes implica un acortamiento de la fase *lag* y un menor nivel de represión catabólica, siendo a la inversa en los ambientes estables.

A la vista de los resultados obtenidos en el mutante MPO209, que tiene interrumpido el gen *phaC* para la síntesis de gránulo y que está afectado en la inducción pero no en la represión de los genes *thn* en condiciones de represión catabólica, podría deducirse que la acumulación de PHB en TFA funciona como señal interna del estado fisiológico y determina, hasta cierto punto, una inducción más temprana o más tardía de los genes de degradación de tetralina. Esta hipótesis resulta plausible dado que la acumulación de gránulos de PHB en las bacterias supone una estrategia de acumulación del exceso de carbono y/o poder reductor (Madison *et al.*, 1999) y que responde al incremento en la relación carbono/nitrógeno (Brandt *et al.*, 2012, Tal *et al.*, 1990). No obstante, habría que confirmar la posibilidad de que la síntesis del polímero determine en mayor o menor medida el nivel de inducción/ represión de los genes de degradación de tetralina mediante un estudio detallado de la evolución de la acumulación de PHB y la expresión *thn* en el tiempo y en presencia de las distintas fuentes de carbono.

1.2. Análisis del proteoma de TFA en condiciones de represión catabólica

Como segunda aproximación para la comprensión de la fisiología de *S. macroglutabida* TFA en condiciones de represión catabólica, se elaboraron dos análisis distintos del proteoma de la bacteria, siendo estos los primeros análisis proteómicos a nivel global que se han desarrollado en este microorganismo.

En ambos casos se pretendía obtener información detallada sobre el efecto que tenía sobre el proteoma y, por tanto, sobre el funcionamiento celular, la exposición de los cultivos de bacterias a las condiciones de represión catabólica. Para poder apreciar

cambios en el patrón de expresión de proteínas era imprescindible disponer de una situación de referencia en la que el fenómeno de represión catabólica fuera inexistente, y para ello se empleó la condición de crecimiento en tetralina como única fuente de carbono.

La naturaleza de la condición de represión catabólica (en la que la bacteria dispone de un mayor número de fuentes de carbono y, además, de una fuente de carbono más fácilmente metabolizable) conlleva una mayoría de cambios en las células que no están tan relacionados con el mecanismo subyacente de regulación en sí como con otros cambios que pueden producirse en paralelo y que implican alteraciones, por ejemplo, en la velocidad de crecimiento de los cultivos o en las capacidades metabólicas (Bernhardt *et al.*, 2003). Estos cambios proteómicos asociados a las alteraciones metabólicas resultan aún de gran interés y son los más fácilmente detectables. Por el contrario, conseguir visualizar y aislar proteínas relacionadas con los procesos de regulación suele ser improbable aplicando técnicas de resolución del proteoma en gel, ya que las proteínas reguladoras están presentes en concentraciones muy bajas en relación a otras proteínas estructurales muy mayoritarias. Por otro lado, ciertas cascadas de regulación y señalización no son controladas a nivel transcripcional, sino a nivel post-traducciona (Ozlu *et al.*, 2010), por lo que cabría no esperar en esos casos una expresión diferencial evidente.

A pesar de la dificultad que se conoce *a priori* sobre la detección de proteínas con baja abundancia relativa en las células (como suele ocurrir con las proteínas reguladoras, (Stasyk *et al.*, 2004), el estudio del resto del proteoma resulta de gran interés no sólo por su capacidad diagnóstica a nivel fisiológico, sino porque puede facilitar el estudio del proceso biológico aplicando otras estrategias complementarias. En este sentido, el estudio de los cambios (de cualquier naturaleza) en el proteoma a lo largo del tiempo puede llegar a permitir el establecimiento de “regulones”, grupos de genes que se regulan al mismo tiempo y mediante un mecanismo común. La detección de regulones, a su vez, sirve como base para la identificación de elementos reguladores en *cis* en los promotores de los genes conjuntamente regulados. Si este tipo de información se acompaña de datos de otra naturaleza (por ejemplo datos transcriptómicos, información sobre mutantes afectados en el proceso de estudio, etc.) puede llegar a convertirse en una herramienta realmente potente (Bernhardt *et al.*, 1997, Voigt *et al.*, 2007, Schroeter *et al.*, 2011).

A pesar de que los dos estudios proteómicos realizados en TFA se desarrollaron experimentalmente de manera distinta, ya que en uno de ellos se compararon las dos condiciones en situación estática (en un único punto del crecimiento) y en el otro en

situación dinámica (evolución del proteoma a lo largo del tiempo), los resultados obtenidos generaron aproximadamente la misma información sobre la fisiología y el metabolismo de la bacteria.

Tras el estímulo de represión catabólica, se detectó una disminución evidente de la expresión de la mayoría de las proteínas Thn, de cualquiera de los operones *thn*. Este cambio pudo detectarse tras tan sólo 5 minutos en presencia de β -HB, poniendo de manifiesto el efecto inmediato del fenómeno de represión catabólica sobre los genes *thn*. Junto a la expresión de las proteínas Thn disminuyó también la de una citocromo P450 y la de una dioxigenasa de protocatecuato. Aunque las citocromos P450 componen una extensa familia de enzimas involucradas en un amplio rango de funciones metabólicas, para algunas de ellas, como la CYP108D1 de *Novosphingobium aromaticivorans*, se ha demostrado una implicación directa en la hidroxilación de compuestos aromáticos (Bell *et al.*, 2012). Por su lado, la dioxigenasa de protocatecuato es una enzima que cataliza la apertura del anillo aromático del protocatecuato y de otros sustratos relacionados (Noda *et al.*, 1990). La expresión de estas dos últimas proteínas en las condiciones de crecimiento en tetralina podría estar respondiendo al lento crecimiento en estas condiciones o deberse a una inducción gratuita, fenómeno observado en ocasiones en los microorganismos (Fraaije *et al.*, 1997) como anticipación de la posible disponibilidad en el medio de otros compuestos que pudieran usarse como fuentes de carbono (en este caso, protocatecuato u otras moléculas aromáticas). Si este último fuera el caso, sería esperable que la expresión de esas dos enzimas disminuyera rápidamente en presencia de β -HB al igual que lo hacen las enzimas de degradación de tetralina, dado que la condición de represión catabólica implica la disponibilidad de fuentes de carbono preferenciales.

Además de la represión sobre la ruta de degradación de tetralina, se produjeron cambios de abundancia muy evidentes para otras enzimas del metabolismo de TFA. Por ejemplo, un gran número de enzimas del ciclo de Krebs o de su variante del ciclo del glioxilato aumentaron su expresión en β -HB. Tres enzimas (isocitrato liasa, succinil-CoA ligasa y fumarato hidratasa) se detectaron como sobreexpresadas en las condiciones de represión catabólica en ambos experimentos proteómicos. Además, la aconitasa y la malato sintasa (detectadas mediante 2D-DIGE) y la malato deshidrogenasa (identificada en los ensayos de proteómica radiactiva) sufrieron también un aumento de expresión. Estos cambios implican un mayor funcionamiento del ciclo de Krebs, necesario para la producción de ATP, poder reductor e intermediarios biosintéticos (oxalacetato y

oxoglutarato). La producción de acetil-CoA, que debe generarse a mayor velocidad tras el metabolismo del β -HB, podría estar promoviendo una mayor actividad de este ciclo metabólico. La expresión al alza de la isocitrato liasa y la malato sintasa pone de manifiesto que el isocitrato generado al principio del ciclo debe estar recirculándose hacia la formación de glioxilato, y consecuentemente malato, gracias a la operatividad de esta otra variante del ciclo de Krebs que evita la pérdida de dos átomos de carbono en forma de CO_2 . La expresión de estas enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del ciclo del glioxilato en condiciones favorables de crecimiento coincide con lo observado en otros estudios proteómicos realizados en *Sphingopyxis alaskensis* (Williams *et al.*, 2009)

Sólo un par de enzimas del ciclo de Krebs redujeron su expresión tras el estímulo de represión catabólica. Por un lado, la citrato sintasa, que experimentó una bajada de su expresión tras 30 minutos en presencia del β -HB. La citrato sintasa es la primera enzima del ciclo de Krebs y, puesto que determina la tasa de funcionamiento del mismo (Jin *et al.*, 1994), es una de las principales dianas de regulación. Así, se ha demostrado para algunas bacterias que el NADH (uno de los productos del ciclo de Krebs) inhibe fuertemente la actividad de esta enzima (Senior *et al.*, 1971) o que la expresión de la misma es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento (Park *et al.*, 1994). Es probable, por tanto, que tras 30 minutos en presencia de β -HB, la expresión de la citrato sintasa decaiga porque ha transcurrido el tiempo suficiente como para que se hayan generado en la célula las señales indicativas de suficiencia de productos del ciclo de Krebs que permiten a la bacteria desarrollarse y dividirse a mayor velocidad. La otra enzima que redujo su expresión es la proteína anotada en TFA como una “piruvato flavodoxina/ ferredoxina oxidorreductasa” (locus 2362) y que es homóloga a la proteína KorA de *Mycobacterium tuberculosis* (presentando un 69% de similitud y un 54% de identidad con un 98% de cobertura). La proteína KorA de *M. tuberculosis* es una de las subunidades de una 2-oxoglutarato ferredoxina oxidorreductasa (implicada en la formación de succinil-CoA desde 2-oxoglutarato), similar a las que operan en el ciclo de Krebs de bacterias anaerobias, pero con una gran estabilidad en condiciones aerobias en el caso de la micobacteria. Se ha demostrado que *Mycobacterium* utiliza dos ciclos de Krebs alternativos: uno que funciona en paralelo a la β -oxidación de ácidos grasos (y que es dependiente del complejo KorAB) y otro que opera en ausencia de la β -oxidación (y que es dependiente de la proteína Kgd o 2-oxoglutarato deshidrogenasa) (Baughn *et al.*, 2009). TFA posee homólogos de las proteínas KorA y KorB (loci 2361 y 2362), pero también los genes para el complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa más común (loci 948 y 949). Es posible que durante el crecimiento en

192

tetralina (cuyo metabolismo implica la β -oxidación del ácido pimélico resultante) la 2-oxoglutarato ferredoxina oxidorreductasa similar a KorA esté regulada al alza asemejándose a lo observado para *M. tuberculosis*.

También relacionado con el ciclo de Krebs, se produjo un cambio de expresión en la piruvato carboxilasa, que disminuye su expresión tras 5 minutos de la aplicación a los cultivos del estímulo de represión catabólica, lo que implica que es una proteína más abundante durante el crecimiento en tetralina. La piruvato carboxilasa es una enzima que conecta la glucólisis/gluconeogénesis con el ciclo de Krebs, ya que forma parte del nodo PEP-piruvato-oxalacetato, esencial para el control del flujo de carbono entre los procesos catabólicos, anabólicos y de suministro de energía (Sauer *et al.*, 2005). En concreto, esta enzima está implicada en la reacción de carboxilación del piruvato para rendir oxalacetato, haciendo posible la reposición de este compuesto empleado como precursor de diversas rutas anabólicas y, fijando, al fin y al cabo, el carbono proveniente del CO₂ en los esqueletos carbonados (Wood *et al.*, 1965). La otra vía posible para el piruvato es la producción de acetil-CoA gracias a la actuación del complejo piruvato deshidrogenasa. Ambos tipos de entradas del piruvato en el ciclo de Krebs suelen darse bajo condiciones glucolíticas. Sin embargo, durante el crecimiento en fuentes de carbono que acceden al metabolismo central via acetil-CoA (por ejemplo los ácidos grasos), debe haber una descarboxilación del oxalacetato o malato para la producción de piruvato o PEP, que se encaminarán a la síntesis de intermediarios glicolíticos (Hansen *et al.*, 1974). Dada su importancia, está descrito que la regulación del nodo PEP-piruvato-oxalacetato en las células puede llegar a ser muy complejo (Petersen *et al.*, 2000). A pesar de que el crecimiento en tetralina no es exactamente una condición “glucolítica”, sí es cierto que el metabolismo de esta molécula, a diferencia del metabolismo del β -HB, rinde piruvato además de acetil-CoA. Esta diferencia y la limitación real de disponibilidad de carbono en estas condiciones podría estar promoviendo una mayor necesidad (y por tanto expresión) de la piruvato carboxilasa en estas condiciones. Así, es posible que durante el crecimiento en tetralina la formación de oxalacetato se produzca mayoritariamente a partir de piruvato y, en presencia de β -HB, como consecuencia del ciclo del glioxilato.

Otra de las proteínas específicamente inducidas en la condición de represión catabólica e identificada en los experimentos 2D-DIGE, es la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que participa en la ruta de Entner-Duodoroff para la producción de piruvato y, en sentido contrario, en las reacciones gluconeogénicas. En los experimentos

radiactivos se detectó, también sobreexpresada, la enzima fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, que cataliza la condensación de dihidroxiacetona y gliceraldehído-3-fosfato para formar fructosa-1,6-bisfosfato en sentido gluconeogénico o la reacción inversa hacia la formación de gliceraldehído-3-fosfato, que puede ser transformado a través de la ruta de Entner-Duodoroff o la glucólisis hasta la producción de piruvato. Es posible que estas enzimas estén funcionando más hacia el sentido gluconeogénico que hacia la formación de piruvato, ya que las células deben estar requiriendo un mayor suministro de intermediarios para las rutas anabólicas (por ejemplo glucosa-6-fosfato para la ruta de las pentosas-fosfato) en condiciones de crecimiento a expensas de β -HB. Nuevamente, los estudios proteómicos descritos para *S. alaskensis* ponen de manifiesto, también en esta bacteria, que ambas enzimas se expresan en condiciones de crecimiento con suficiencia de carbono (Williams *et al.*, 2009)

Relacionado con el ciclo de síntesis y degradación de PHB (que incluye la degradación del β -HB), se registró una disminución de la expresión de 2 proteínas acetil-CoA acetiltransferasas diferentes tras 15 minutos de la adición de β -HB a los cultivos creciendo en tetralina. La reacción catalizada por esta enzima consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA siendo esta reacción, en otras bacterias (Budde *et al.*, 2010), la primera reacción del ciclo de síntesis de PHB. Por el contrario, se detectó un aumento en la expresión de la misma 3-oxoácido-CoA transferasa (o tioforasa) tanto en los experimentos 2D-DIGE como en los de proteómica radiactiva en las condiciones de represión catabólica. Esta enzima está implicada en la degradación del β -HB en bacterias como *A. beijerinckii* (Senior *et al.*, 1973), y su expresión podría concordar con el uso que las células deben estar haciendo de este ácido carboxílico como fuente de carbono. En las mismas condiciones se detectó, también mediante 2D-DIGE, un aumento de abundancia de la polihidroxibutirato depolimerasa y de una fasina. La primera participa en la degradación del PHB. La segunda, es una de las proteínas que recubre a los gránulos de PHB y que regula su tasa de síntesis y su tamaño (Potter *et al.*, 2005). Las muestras proteicas de los ensayos 2D-DIGE provenían de cultivos que habían sido crecidos durante 12 horas (hasta fase exponencial) en condiciones de represión catabólica, lo que posibilita que, además de la síntesis de PHB, se produjera cierta degradación del gránulo, estableciéndose quizás un equilibrio.

En cuanto a la degradación (o β -oxidación) de ácidos grasos, un total de 4 enzimas implicadas en las fases de oxidación (dos acil-CoA deshidrogenasas diferentes y una 3-

hidroxiacil-CoA deshidrogenasa) e hidratación (una enoil-CoA hidratasa) disminuyeron en abundancia tras la adición de β -HB al cultivo creciendo a expensas de tetralina. Dado que los genes de β -oxidación de la ruta de degradación de tetralina no son esenciales para el crecimiento a expensas de este compuesto aromático, puede que las enzimas previamente nombradas (cuya expresión parece ser mayoritaria durante el crecimiento en tetralina) formen parte del set alternativo de enzimas de TFA capaces de llevar a cabo la β -oxidación del ácido pimélico producido en el metabolismo de la tetralina.

De entre las proteínas inducidas en condiciones de represión catabólica en los ensayos 2D-DIGE que tienen que ver con el metabolismo de los aminoácidos, merece la pena destacar la presencia de 2 aminotransferasas (codificadas por genes distintos), de una glutamato deshidrogenasa y de una metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa, ya que catalizan reacciones de importancia para la conexión del metabolismo de los aminoácidos con el metabolismo del carbono. Las aminotransferasas transfieren grupos amino entre aminoácidos y oxoácidos, produciendo la interconversión entre ellos y conectando el metabolismo de los aminoácidos con la gluconeogénesis, reflejando la tendencia anabólica de las condiciones de represión catabólica. La glutamato deshidrogenasa, por su lado, participa tanto en la degradación como en la síntesis de glutamato gracias a la reacción reversible de producción de dicho aminoácido a partir de 2-oxoglutarato. El glutamato juega un papel fundamental como donador de grupos α -amino en las células y el 2-oxoglutarato puede entrar en el ciclo de Krebs y producir oxalacetato, a partir del cual puede sintetizarse fosfoenolpiruvato para la gluconeogénesis. Previsiblemente, esta enzima está actuando en sentido anabólico de producción de glutamato a partir de oxoglutarato en las condiciones de represión catabólica, que suponen un ambiente favorable para el rápido desarrollo y división de las células. Por último, la metilmalonato semialdehído deshidrogenasa (altísimamente inducida en los ensayos 2D-DIGE y en los de proteómica radiactiva) cataliza la producción de propionil-CoA a partir de metilmalonato-semialdehído, un producto de la degradación de la valina. El propionil-CoA puede encaminarse, por ejemplo, a la producción de lactato o la producción de succinil-CoA (que entraría en el ciclo de Krebs).

En la figura 61 se muestra una reconstrucción del metabolismo del carbono según los resultados de expresión obtenidos en los ensayos proteómicos discutidos hasta ahora.

Tras la adición de β -HB a los cultivos se produjo también un aumento de ciertas enzimas implicadas en la síntesis de aminoácidos, como por ejemplo la aspartato-semialdehído deshidrogenasa, la 2-isopropilmalato sintasa, la cetol-ácido reductoisomerasa y la serina hidroximetiltransferasa, de las rutas de síntesis de lisina, leucina, valina y glicina, respectivamente. Finalmente, la adenosilhomocisteinasa, que participa en el ciclo de regeneración de la S-adenosil-metionina (donador importante de grupos metilos en las células) vio también incrementada su expresión en ambos ensayos proteómicos en las condiciones de represión catabólica. La mayor presencia de todas estas enzimas implicadas en la síntesis de aminoácidos pone de manifiesto la tendencia anabólica del metabolismo en presencia de β -HB. En *B. licheniformis*, la expresión de algunas de estas enzimas (2-isopropilmalato sintasa y cetol-ácido reductoisomerasa) también es mayoritaria durante la fase exponencial de crecimiento en presencia de una buena fuente de carbono (Bernhardt *et al.*, 2003)

En comparación con el crecimiento en tetralina, la adición de β -HB a los cultivos produjo una disminución evidente en la expresión de las enzimas implicadas en la degradación de proteínas y aminoácidos (peptidasas M20 y M28, cisteín proteasa, peptidil dipeptidasa y peptidasa dependiente de metal), sugiriendo que durante el crecimiento en tetralina las células se ven obligadas a reciclar parte de su propio material proteico, bien debido a los daños oxidativos causados por la tetralina en estas macromoléculas (Ferrante *et al.*, 1995) o bien para permitir el uso de los monómeros resultantes en los procesos anabólicos y poder sobrellevar el crecimiento a expensas de una fuente de carbono no tan eficiente. En *B. subtilis*, por ejemplo, se ha demostrado que se produce un incremento drástico en la proteólisis y recambio de proteínas en condiciones de estrés motivado por el hambre de carbono (Gerth *et al.*, 2008).

En el mismo sentido, la adición de β -HB reduce la expresión de ciertas proteínas implicadas con la respuesta a estrés: enzimas para el plegado de proteínas y ARN (Peptidil-prolil cis-trans isomerasa tipo PpiC ó tipo ciclofilina –Lazar *et al.*, 1996–, chaperoninas), catalasa (Brioukhanov *et al.*, 2006), peroxirredoxina (Poole, 2005), ferritina Dps (para la protección del ADN en condiciones de hambre en *E. coli*; Jeong *et al.*, 2008), proteína de resistencia a aniones tóxicos, etc., lo que vuelve a poner de manifiesto el estado de estrés fisiológico que experimentan los cultivos durante el crecimiento a expensas de tetralina.

Dado que el β -HB es una fuente de carbono preferencial en TFA y permite un mejor desarrollo de las células y una mayor tasa de crecimiento, se observa una tendencia

general hacia las rutas anabólicas y hacia procesos que reflejan una mayor activación del metabolismo bacteriano. Así, se produce una mayor abundancia en las enzimas implicadas en la síntesis de purinas y pirimidinas (enzima bifuncional PurH o GMP sintasa), en los procesos de transcripción y traducción (subunidad β de la ARN polimerasa, proteínas ribosomales, aminoacil-tRNA ligasas y factores de elongación) o en la producción de energía (subunidades α y β de la ATP sintasa). El mismo efecto está descrito para *B. licheniformis* creciendo a expensas de glucosa (Bernhardt *et al.*, 2003).

En cuanto a los procesos de señalización, la proteína tipo OmpA/MotB se expresó casi 8 veces más durante el crecimiento en tetralina. Las proteínas OmpA de membrana externa están implicadas en múltiples procesos en enterobacterias: funcionan como adhesinas, participan en la formación de biofilm y sirven de receptores para bacteriófagos (Smith *et al.*, 2007). Las proteínas MotB, por su parte, son parte del motor del flagelo en *E.coli* (Blair *et al.*, 1991). Está descrito que las proteínas OmpA y MotB comparten un dominio C-terminal común que puede estar implicado en la interacción con el peptidoglicano (De Mot *et al.*, 1994). Podría especularse que proteínas del tipo OmpA/MotB promueven la formación de adhesiones intercelulares en TFA, favoreciendo la protección de las células en las condiciones adversas asociadas al crecimiento en tetralina.

Durante el crecimiento en este compuesto aromático fue también mayoritaria la expresión de dos proteínas receptoras dependientes de TonB y diferentes a ThnM. Este tipo de transportadores de membrana externa son muy abundantes en las bacterias pertenecientes al orden *Sphingomonadales* y promueven el transporte de alta afinidad de sideróforos, citrato, grupos hemo y transferrinas, así como de vitamina B12 o B1 y metales (por ejemplo níquel) (Tang *et al.*, 2012). Además, ciertos estudios experimentales demuestran que también existen entre las bacterias proteínas TonB capaces de mediar el transporte de carbohidratos, aminoácidos o ácidos orgánicos (Blanvillain *et al.*, 2007, He *et al.*, 2008). Además de esas funciones, se ha descrito que el sistema TonB es necesario para el funcionamiento de bombas de eflujo involucradas en mecanismos de tolerancia a solventes y drogas en *Pseudomonas putida* DOT-T1E (Godoy *et al.*, 2001). Se podría asignar un papel a estos transportadores en procesos de detoxificación en TFA (dado que la tetralina resulta tóxica por encima de cierta concentración) o en procesos de transporte de fuentes de carbono alternativas (teniendo en cuenta que el compuesto aromático no es fácilmente metabolizable).

En cuanto a las proteínas no caracterizadas, se detectaron tres (dos durante el crecimiento en tetralina y una en las condiciones de represión catabólica), pero para ninguna de ellas ha podido inferirse función alguna a través de su secuencia proteica, ya que no poseen dominios específicos reconocibles. Sólo una de ellas presenta un entorno génico que podría ayudar a proponer una función. Es el caso de una de las proteínas reguladas a la baja tras el estímulo de represión catabólica: está codificada por el gen 2987, que se expresa en el cromosoma en la misma dirección y justo aguas arriba de todo un operón dedicado a quimiotaxis (genes *CheAWYBR*). Entre el gen en cuestión y el aparente operón *Che* existen 51 pb de separación, por lo que es posible que la función de la proteína codificada por este gen esté relacionada con la de los genes de quimiotaxis.

En resumen, puede decirse que los experimentos de proteómica consiguieron arrojar una gran cantidad de información sobre el metabolismo de TFA en condiciones de represión catabólica. Además, se consiguieron identificar un par de proteínas con potencial interés en regulación: la proteína transductora de señales con dominios CBS y el regulador transcripcional CdnL, de los que se discutirá en los siguientes apartados.

En cuanto a la idoneidad de una u otra aproximación proteómica para el objetivo que se perseguía, cabe decir que ambas técnicas (de marcaje fluorescente o radiactivo) resultaron eficaces en cuanto a sensibilidad en la detección de cambios entre las condiciones a comparar. El factor limitante radica, por el contrario, en la calidad de los sistemas de aislamiento de *spots* en los geles preparativos (realizados manualmente en este caso) y en las limitaciones específicas de los sistemas de identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas (cuyo éxito depende, en parte, de la abundancia de la proteína). En el caso de los experimentos radiactivos en concreto, pudo apreciarse una gran diferencia entre la señal radiactiva detectada para algunos *spots* y su abundancia real en los geles. Así, las proteínas cuya síntesis se producía en las células desde antes de los tiempos de análisis y, además, continuaban sintetizándose durante la experimentación, producían una determinada señal radiactiva (relativa sólo a la cantidad de proteína sintetizada *de novo* durante el análisis) pero se manifestaban abundantes en los geles porque su síntesis había sido acumulativa. Por el contrario, las proteínas de nueva síntesis tras el estímulo de represión catabólica podían generar una señal intensa en las imágenes radiactivas pero su abundancia era pobre en los geles debido a la falta de acumulación.

Finalmente, la aproximación de marcaje radiactivo para la visualización de cambios a lo largo del tiempo no ha conseguido aportar ninguna información extra relativa a la evolución temporal del proteoma. Como se comentó al inicio de esta discusión, varios autores han conseguido, valiéndose de información adicional, detectar y establecer regulones dentro del proteoma (Bernhardt *et al.*, 1997, Voigt *et al.*, 2007, Schroeter *et al.*, 2011). Durante el desarrollo de esta tesis se ha podido tener acceso a datos transcriptómicos (de “RNA sequencing”) preliminares de *S. macroglutabida* TFA. Empleándolos en paralelo a los resultados proteómicos se ha iniciado, mediante análisis *in silico*, la detección de secuencias reguladoras comunes (aguas arriba de los sitios de inicio de la transcripción) entre las proteínas reguladas al alza o a la baja tras el estímulo de represión catabólica. No obstante, este estudio realizado en TFA se encuentra muy en los inicios y es pronto para obtener conclusiones.

Finalmente, un estudio del fosfo-proteoma de TFA en las condiciones de represión catabólica generaría, quizás, mayor información directamente relacionada con los procesos de regulación. Puesto que la base molecular de la represión catabólica en TFA sigue manteniendo muchas incógnitas, no puede descartarse que parte del proceso de regulación sea llevado a cabo mediante modificaciones post-traduccionales. En *B. subtilis*, por ejemplo, han podido detectarse las fosforilaciones de algunos componentes del sistema PTS, de una quinasa sensora de un sistema de dos componentes y de algunos reguladores transcripcionales mediante el estudio del fosfoproteoma en condiciones de exceso de carbono (Macek *et al.*, 2007)

2. Elementos específicos potencialmente implicados en represión catabólica

2.1. El regulador transcripcional CdnL

Entre los resultados obtenidos en los ensayos de proteómica hubo dos proteínas que resultaron de interés por su patrón de expresión y por su posible papel en regulación. Una de ellas es el regulador transcripcional CdnL (con identificador EBMC1_01455), cuya expresión en las condiciones de represión catabólica fue 4,7 veces mayor que en las condiciones de crecimiento en tetralina según los experimentos 2D-DIGE (Tabla 8 de Resultados).

Como ya se describió en el apartado de resultados, la proteína CdnL de TFA pertenece a la familia “CarD_TRCF” (Pfam 02559), que incluye a varias proteínas con un dominio común de interacción con la subunidad β de la ARN polimerasa: las proteínas CarD de *Myxococcus xanthus* y otras bacterias (Elias-Arnanz *et al.*, 2010), los reguladores CdnL (generalmente muy pequeños -150-200 residuos- y altamente parecidos al extremo N-terminal de las proteínas CarD) y los factores TRCF de reparación del ADN acoplada a la transcripción, que evitan que la ARN polimerasa quede parada y retenida en zonas dañadas del ADN (Selby *et al.*, 1995).

La proteína CdnL de TFA resultó tener un alto parecido con las correspondientes de *Myxococcus xanthus*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*, únicos casos en los que la función de esta proteína ha sido estudiada en mayor profundidad.

En el caso de las micobacterias *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, los autores proponen una función relacionada con la respuesta estricta para CdnL. Así, está descrito que la expresión génica del regulador aumenta ante limitación de nutrientes, daño en el ADN y estrés oxidativo y, además, que esta proteína está involucrada en el control de la expresión de numerosos genes, habiéndose detectado cambios en la transcripción de cerca de 400 de ellos, y siendo los más regulados a la baja los pertenecientes a la biosíntesis de aminoácidos o involucrados en los procesos de traducción (genes para ARNr y proteínas ribosomales) (Stallings *et al.*, 2009). Se postula que CdnL desempeña, por tanto, una función muy parecida a la conocida para DksA en otras bacterias y, en efecto, pruebas experimentales demuestran que este regulador de micobacterias es capaz de complementar parcialmente el fenotipo de los mutantes de delección de *dksA* en *E. coli* (Stallings *et al.*, 2009). Sin embargo, DksA de *E. coli* no complementa el fenotipo de delección de CdnL en micobacterias (que carecen de DksA endógeno). Por último, se ha confirmado la capacidad de interacción con la subunidad β de la ARN polimerasa y el requerimiento de dicha interacción para las funciones de CdnL de micobacterias (Weiss *et al.*, 2012, Gulten *et al.*, 2013).

M. xanthus posee tanto el regulador CdnL como la proteína DksA, y ambos resultan esenciales para la supervivencia de esta bacteria, lo que sugiere que CdnL no debe estar relacionado con la respuesta estricta. No obstante, no puede descartarse esa posibilidad por completo. Los ensayos realizados demuestran que la sobreexpresión de la proteína CdnL no tiene ningún efecto, pero sí su carencia, que afecta a la capacidad de división de las células y, en consecuencia, las hace más alargadas (García-Moreno *et al.*, 2010). Los

autores postulan, en este caso, un posible papel en la regulación de algún gen esencial y no descartan alguna función directamente relacionada con la división celular.

El único otro caso descrito en la bibliografía sobre el estudio de CdnL es el de la proteína, llamada LtpA en la bibliografía, de *Borrelia burgdorferi* (espiroqueta causante de la enfermedad de Lyme). Para este regulador, homólogo del CdnL de *M. xanthus*, se ha descrito el patrón de expresión diferencial a nivel transcriptómico y proteómico en función de la temperatura (que mimetiza bien el entorno del vector – garrapata- o bien el entorno del hospedador –mamíferos- de esta bacteria patógena), pero no ha resultado posible estudiar su función debido a la letalidad de los mutantes de delección (Yang *et al.*, 2008). Los autores sugieren, en el caso de *Borrelia*, que la expresión del regulador LtpA, mayoritaria en las condiciones que simulan el entorno del vector, sería esencial para la regulación de genes importantes que controlan su supervivencia en esa ubicación.

La letalidad de los mutantes de delección de CdnL es, al parecer, el único fenotipo común observado entre las bacterias en las que se ha intentado estudiar la función de este regulador. El análisis de su función no habría sido posible en micobacterias ni en *M. xanthus* de no ser por el uso de promotores condicionales que permitían el control de su expresión. Sorprendentemente, el gen CdnL de *B. subtilis* no es esencial para la supervivencia, siendo este el único caso descrito (Kobayashi *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta que se desconocía por completo si la proteína CdnL de TFA resultaría también esencial para su supervivencia, se intentó, sin éxito, la construcción de un mutante de delección. Los resultados pusieron de manifiesto, apoyados en la información bibliográfica, que el gen *cdnL* debía ser imprescindible para la supervivencia de TFA. Además, la estrategia de construcción de mutantes de delección o sustitución empleando el plásmido suicida pEX18tc ya había sido puesta a prueba eficientemente para la construcción de otros mutantes de TFA descritos en esta Tesis, por lo que se descartó que la imposibilidad en la construcción del mutante estuviera relacionada la estrategia aplicada en sí.

El segundo diseño experimental llevado a cabo fue el intento de construcción de un mutante condicional de CdnL mediante el uso del promotor *PsaI* regulable por salicilato y empleado por primera vez en TFA. A pesar de la funcionalidad comprobada de este promotor en TFA, la nueva estrategia tampoco dio resultado. Las razones que podrían motivar este fracaso son principalmente dos: por un lado, que el nivel de expresión del

cdnL silvestre desde *Psal* fuera o bien insuficiente en presencia de salicilato o, por el contrario, excesivo incluso en ausencia del inductor (siendo esta posibilidad más improbable), como para permitir la supervivencia de las células. Por otro lado, que la región de homología (de 364 pb) suministrada en el plásmido que debía integrarse no tuviera una longitud óptima para facilitar el evento de recombinación.

Para solucionar el primer problema podría intentarse la construcción del mutante condicional empleando un promotor distinto. El uso del promotor P_{tet} regulable por tetraciclina podría llegar a constituir una buena alternativa. Aunque nunca se ha empleado en TFA y, por tanto, se desconoce su funcionalidad en esta bacteria, sí ha sido usado con éxito en otra α -proteobacteria, *Magnetospirillum gryphiswaldense* (Borg *et al.*, 2014), y fue, además, el promotor empleado para la construcción del mutante condicional de *cdnL* en *M. tuberculosis* (Stallings *et al.*, 2009). En cuanto a la posibilidad de que la longitud de la región de homología suministrada para la recombinación fuera insuficiente, sería recomendable entonces aplicar una estrategia de intercambio del promotor de *cdnL* por el promotor condicional mediante un doble evento de recombinación que permitiera el uso de dos regiones de homología lo suficientemente extensas. La opción de emplear una mayor longitud del gen *cdnL* como región homóloga e integrar el plásmido mediante un único evento de recombinación dejaría de ser una estrategia óptima porque la región codificante de este gen es muy pequeña (apenas 531 pb) y requeriría mantener un porcentaje muy alto de la secuencia silvestre del gen *cdnL* bajo su propio promotor en la construcción final en el cromosoma de TFA. En resumen, quizás una nueva estrategia que combinara ambas soluciones (uso del promotor P_{tet} y sustitución del promotor silvestre mediante un doble evento de recombinación) sería la opción más apropiada.

Sin duda, el estudio de la función de este gen sigue despertando interés por varias razones. En primer lugar, porque a pesar de que no existe ningún caso en la bibliografía en el que se haya descrito la implicación de esta proteína en los procesos de represión catabólica, no puede obviarse que su expresión fue diferencial en esas condiciones en comparación con las condiciones de crecimiento en tetralina. Además, pocos son los casos hasta la fecha en los que se ha conseguido inferir alguna función para este regulador transcripcional (apenas en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* y muy parcialmente en *M. xanthus*), a pesar de ser una proteína ampliamente distribuida en bacterias (Cayuela *et al.*, 2003), lo que hace de CdnL un regulador transcripcional de importancia aún desconocida. Adicionalmente, el estudio de CdnL en las micobacterias y en *Myxococcus* parece poner en

evidencia la potencial especificidad de función de este regulador en cada grupo, lo que permite no descartar ninguna hipótesis para el caso de TFA. Los estudios experimentales desarrollados en *M. xanthus* en los que se ha intentado complementar el fenotipo del mutante *cdnL* con proteínas homólogas de otras bacterias (elegidas en función de la mayor o menor identidad de sus CdnL con el de *Myxococcus*, de su porcentaje GC genómico o de su posesión/carencia de DksA) o con el extremo N-terminal de la proteína CarD de la misma bacteria (altamente similar a CdnL) demuestran, de hecho, que la complementación no es posible (Garcia-Moreno *et al.*, 2010).

Finalmente, la proteína CdnL no solo es atractiva por su interacción con la ARN polimerasa, sino que un par de estudios recientes demuestran que el dominio C-terminal de las proteínas CdnL de *M. tuberculosis* (Gulten *et al.*, 2013) y de *Thermus thermophilus* (Srivastava *et al.*, 2013) constituyen un dominio de unión a ADN cuya tipología no responde a ninguna de las hasta ahora conocidas en las bases de datos. Está descrito, para el caso de *M. tuberculosis*, que la eliminación únicamente del dominio RID (RNA polymerase Interaction Domain) no fenocopia exactamente la eliminación del gen completo, por lo que el total de funciones de CdnL debía estar mediado, adicionalmente, por otros mecanismos alternativos a la interacción con la ARN polimerasa. Aunque para los dos casos (en *M. tuberculosis* y en *T. thermophilus*) el tipo de interacción con el ADN es inespecífico de secuencia, aún determina una parte fundamental del mecanismo de acción de CdnL. Los experimentos de cristalografía de rayos X, ensayos de expresión *in vivo* con fusiones génicas y de transcripción *in vitro*, ponen de manifiesto que el dominio N-terminal (RID) de CdnL interacciona con la subunidad β de la ARN polimerasa y que, en consecuencia, el dominio C-terminal de CdnL se posiciona hacia la interacción con el promotor del DNA. La interacción simultánea con la ARN polimerasa y el promotor facilita la formación del complejo abierto y promueve la transcripción. Se ha demostrado, además, que el dominio de interacción de CdnL es esencial para la viabilidad de las células, ya que los mutantes del gen completo no pueden complementarse empleando únicamente el dominio RID. Finalmente, ambos estudios estructurales coinciden en que la interacción de CdnL con el ADN es puramente electrostática y está mediada por un grupo de residuos de arginina y lisina que conforman un entorno básico alrededor de un residuo de triptófano. En la figura 62 puede observarse que TFA tiene conservados algunos de esos residuos.

```

Mt_P9WJG3      -----MIFKVGDTVVPYHHGAALVEAIEETRTIKGEQKEYLVLKVAQGDLTVRVPAENAEY 55
Sm             MSANTLVFEVGDYVVYPKHGVGRVIELQKSEIAGMQLELYVLRFEKEKMTLRVPTNKAEG 60
Tt_Q5SLX5      ----MKEFRPGDKVVLPPYGVGVVAGIAQRSVSGVSRAYYQVDFPGSRKAYVPVEAPHS 56
               * . ** ** * : * . : * . : . . ** : . .

Mt_P9WJG3      VGV RDVVGQEGLDKVFQVLRAPHTTEPTNWSRRYKANLEKLGSDVNKVAEVVRDLWRRD 115
Sm             VGMRLSSDKTLKEALQVLTTPKPKVRTMWSRRYKAEYEAKINSGDLVSIAEVTRDLFRAD 120
Tt_Q5SLX5      VGLRKALAPEEVPVILDLLKNGRMPLPKQWAAHRKTSEILADGNPYRIAQMAGQLRAWE 116
               ** : * . : : : : : * : * : : : * : : : : : : : : :

Mt_P9WJG3      QERGLSAGEKRMLAKARQILVGELALAESTD DAKAETILDEVLAAS----- 162
Sm             DQPEQSYSERQIFEAAASSRLARELAAMEESDEKTAQAKILQILNEHAPKYVVEKVG 176
Tt_Q5SLX5      VERGLPDLDRQALRRRAIHLLAEVAQSLEITVQEA KRLFEEAWGEELN----- 164
               : . : : : * * . ** . * : : :

```

FIG. 62. Alineamiento de las proteínas CdnL de *M. tuberculosis*, *S. macroglutabida* TFA y *T. Thermophilus* mediante ClustalW. Se muestran en azul (Mt) o rojo (Tt) los residuos de importancia predichos para el dominio de unión al ADN; en verde, los residuos básicos conservados en TFA en las mismas posiciones.

En conclusión, la función fisiológica de CdnL parece ser muy distinta en cada grupo bacteriano pero responder con un mecanismo de acción común, sustentado en la interacción con la ARN polimerasa y las regiones promotoras del ADN. Este tipo de interacción con el ADN independiente de secuencia es común en las proteínas bacterianas asociadas al nucleóide e implicadas en la estructuración del ADN, la replicación y reparación del ADN y en los procesos de transcripción (Basu *et al.*, 2009). En consecuencia, no puede descartarse que a través de estos mecanismos, CdnL esté interviniendo en la base molecular de la represión catabólica en TFA.

2.2. La proteína transductora de señales con dominios CBS

Además del regulador CdnL, una segunda proteína con posible función reguladora y dominios CBS (“Cystathione β -Synthase”) fue identificada en los estudios proteómicos (identificador EBMC1_05664). Su expresión fue 14 veces mayor en las condiciones de crecimiento en tetralina que en las condiciones de represión catabólica en los experimentos 2D-DIGE.

Se trata de una proteína pequeña (de 141 residuos) y anotada como posible proteína transductora de señales debido a la presencia de sus dos dominios CBS. Este tipo de dominios está ampliamente distribuido en cualquier reino de los seres vivos, desde

bacterias hasta humanos, y forma parte de proteínas quinasas, transportadores osmorreguladores en bacterias (Mahmood *et al.*, 2009), IMP deshidrogenasas (implicada en el metabolismo de las purinas), cistación sintasas y pirofosfatasas (Jamsen *et al.*, 2007), entre otras. Está demostrado que estos dominios pueden unir moléculas de AMP, ATP o SAM (S-adenosilmetionina) actuando como sensores del estado energético de la célula (Scott *et al.*, 2004) y regulando la actividad de la proteína de la que forman parte.

Existe el caso llamativo de la proteína CcpN (antes YqzB) de *B. subtilis*, casi tan pequeña como la de TFA (212 residuos) e implicada en la represión catabólica de los genes gluconeogénicos *gapB* (para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *pckA* (para la PEP carboxiquinasa) mediante control negativo. Esta proteína de *B. subtilis* posee dos dominios CBS y un dominio HTH de unión al ADN (Servant *et al.*, 2005).

Los análisis de crecimiento y los de expresión de los genes de tetralina *in vivo* en el mutante de la proteína con dominios CBS de TFA demostraron que la delección del gen *cbs* no produce ninguna alteración en el proceso global de regulación de represión catabólica.

Dado que los cambios en el proteoma no sólo están relacionados con la base molecular de los procesos de regulación, sino con muchos otros cambios a nivel fisiológico en las células, es posible que la proteína CBS identificada esté participando en otro proceso para el cual no hemos hecho estudio de fenotipo. Finalmente, puede que esta proteína no desempeñe su función individualmente, sino como parte de un complejo con otra proteína. En ese caso, quizás la ausencia de función no es detectable si los dominios CBS mutados son prescindibles o pueden sustituirse por otros existentes en el genoma de TFA.

2.3. La quinasa sensora FixL y el regulador transcripcional FixJ

Como estrategia paralela a la construcción de mutantes en elementos identificados en los ensayos proteómicos, se hizo uso de la secuencia génica de TFA disponible y de las referencias bibliográficas en otras bacterias para poder establecer similitudes y nuevas hipótesis y objetivos de estudio.

De esta manera, se inició la investigación sobre la función de varias proteínas del sistema PTS y de las proteínas FixL y FixJ de TFA.

Los referentes bibliográficos que suscitaron el interés por las proteínas FixJ de TFA son los descritos para *Acidovorax sp.KKS102* y *Azoarcus sp. CIB*.

En el caso de la primera β -proteobacteria, se ha demostrado que el activador transcripcional BphQ es esencial para el fenómeno de represión catabólica asociado a la degradación aerobia de bifenilos. Sin embargo, no se ha podido demostrar la implicación de una quinasa sensora BphP (que forma parte aparente del mismo operón) en el proceso de represión catabólica ni en su comunicación con el regulador. Los autores postulan, en consecuencia, que deben existir otras proteínas involucradas en la regulación post-transcripcional de BphQ. Sugieren, por ejemplo, la participación de alguno de los componentes del sistema PTS o la posibilidad de que BphQ module su propia actividad en respuesta al estado energético de la célula (Ohtsubo *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta la similitud de las proteínas FixJ de TFA con el regulador BphQ implicado en el procesos de represión catabólica, se construyeron mutantes carentes de los genes *fixJ* en TFA para poder determinar su función. Aunque parece no ser el caso de *Acidovorax*, existen sistemas de dos componentes en los que la quinasa sensora juega un papel más determinante en el proceso biológico que el regulador, siendo este el caso, por ejemplo, del sistema formado por la quinasa sensora Sma0113 y el regulador de respuesta Sma0114 de *S. meliloti* (ver apartado 2.4 de la Introducción). Ante la posibilidad de que fueran las proteínas FixL (quinasas sensoras) y no los reguladores FixJ los principales implicados en el fenómeno de represión catabólica en TFA, se generaron también mutantes carentes de los componentes FixL. Finalmente, no podía descartarse la posibilidad de comunicación cruzada entre los dos sistemas FixLJ presentes en TFA, ya que existen casos de comunicación cruzada entre varios sistemas de dos componentes implicados en la regulación de una misma diana. En *S. entérica*, por ejemplo, existen un total de 3 sistemas de dos componentes implicados en la regulación del sistema de secreción T6SS (Leung *et al.*, 2011). Se construyeron, por tanto, mutantes carentes de los dos genes *fixL* y de los dos operones *fixLJ*, completando la batería final de mutantes simples y dobles en los genes *fixLJ* descrita en el apartado de resultados de esta Tesis.

Se esperaba, en el caso de que alguna de las proteínas FixJ constituyera un activador transcripcional esencial para la expresión de la ruta de degradación de tetralina

(similar al caso de BphQ en *Acidovorax*) que el crecimiento a expensas de esa fuente de carbono se viera seriamente afectado. Sin embargo, todos los mutantes analizados presentaron un crecimiento de tipo silvestre.

Dado que no podía descartarse que las proteínas FixJ de TFA estuvieran, por el contrario, actuando como represores transcripcionales en condiciones de represión catabólica, se llevaron a cabo ensayos de actividad de la enzima ThnC empleando células crecidas en tetralina o en tetralina con β -HB. La delección o interrupción de los genes FixJ o de los operones completos debía provocar, en el caso de esta hipótesis, una relajación de la represión (reflejado en un mayor nivel de actividad). Nuevamente, tampoco esta posibilidad se confirmó como cierta para ninguno de los seis mutantes construidos.

Dados los resultados obtenidos, se ha descartado la participación de estos sistemas de dos componentes en el fenómeno de represión catabólica en TFA. No obstante, aún se podría especular con un posible papel de estos reguladores en el control de la ruta de degradación de tetralina en condiciones de micro-aerobiosis (en las que se sabe que TFA es capaz de crecer), de manera similar a lo descrito para *Azoarcus* y el represor transcripcional AccR, responsable del fenómeno de represión catabólica asociado a la degradación anaerobia de benzoato.

Además de los elementos de regulación analizados en esta Tesis, existen en TFA genes homólogos a los descritos en otras bacterias como mediadores del fenómeno de represión catabólica.

En el genoma de *S. macroglutabida* hay anotados, por ejemplo, un total de 5 genes codificantes para reguladores de la familia Crp/FNR. Entre ellos, hay uno de tipo FixK y otro de tipo FnrL, proteínas implicadas en otras bacterias en la regulación del nitrógeno (Batut *et al.*, 1989) y del metabolismo en condiciones de aerobiosis/anaerobiosis (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1995), respectivamente. De entre las tres restantes, solo las codificadas por los genes 1989 y 3098 podrían ser similares a CRP de *E.coli*, mostrando un 76 o 75 % de cobertura y un 30 o 20% de identidad, respectivamente.

Otros genes que llaman la atención son los de los *loci* 1012 y 3939, ya que los productos proteicos comparten un 95 y 96% de cobertura y un 28 y 26 % de identidad con la proteína Crc de *P. putida*. Además, TFA posee también varios genes (2104, 2236 y 2123)

cuyos productos se asemejan a la proteína CbrB de la misma bacteria, con un mínimo del 80% de cobertura y un 33% de identidad. Sin embargo, a pesar del mayor o menor parecido a nivel de proteína, no existen razones adicionales que sustenten la posible implicación de estos elementos en represión catabólica en TFA como ocurre en las otras bacterias.

3. El sistema PTS y el fenómeno de represión catabólica en TFA

Como se describió en la introducción de esta Tesis, el sistema PTS es principalmente conocido y estudiado por su función en el transporte y fosforilación de azúcares y por su relevancia en el control del transporte y asimilación de otros azúcares no preferenciales a través de los procesos de represión catabólica (que incluyen “exclusión del inductor” e inactivación de los genes catabólicos).

No obstante, y a pesar de que esta función de transporte de azúcares del sistema PTS es común en *Enterobacteriaceae*, *Vibrionales* y *Firmicutes*, no es la regla común para todas las bacterias y, por el contrario, en muchas de ellas existe, en paralelo a dicho sistema PTS canónico o en su lugar, otro sistema alternativo que parece funcionar más específicamente como sensor de la disponibilidad de carbono y/o nitrógeno y como regulador del metabolismo que como sistema de transporte (Cases *et al.*, 2007).

Dicho tipo de sistema PTS alternativo suele denominarse PTS-Ntr, dado su inicial descubrimiento en *Klebsiella* en relación con la fijación de nitrógeno (Merrick *et al.*, 1989) y, posteriormente, su demostrada participación en el metabolismo del nitrógeno en *E. coli* (Powell *et al.*, 1995) o *P. aeruginosa* (Jin *et al.*, 1994). Sin embargo, en la actualidad se conocen funciones muy distintas asociadas a este sistema PTS alternativo. Cada grupo bacteriano posee unos componentes del sistema y no otros, pero en todos los casos, las funciones resultantes son de tipo regulador y sorprendentemente diversas. Así, se ha implicado al sistema PTS-Ntr en distintos aspectos de la regulación del carbono o del nitrógeno, en virulencia y en la homeostasis del potasio (Pfluger-Grau *et al.*, 2010).

Existen dos casos descritos en los que el sistema PTS^{Ntr} juega un papel fundamental en el fenómeno de represión catabólica. Por un lado, la expresión de los genes para la degradación de tolueno en *P. putida* está sujeta a represión en presencia de glucosa o

succinato y se sabe que dicho control está mediado por el estado desfosforilado del componente EIIA, que reprime la expresión del promotor Pu (del Castillo *et al.*, 2007). Se postula, en este caso, que la actividad de EIIA está regulada por la concentración de metabolitos de la ruta Entner-Duodoroff (Velazquez *et al.*, 2004). Por otro lado, existe el caso de *S. meliloti*, donde se ha demostrado la implicación de otro sistema PTS^{Ntr} en el control de los genes de degradación de galactósidos en presencia de succinato. En este caso, es uno de los dos estados alternativos de fosforilación de la proteína Hpr (o NPr) la que desencadena el proceso de represión catabólica (Pinedo *et al.*, 2009).

En TFA se han construido mutantes de delección o sustitución en tres de los genes potencialmente implicados en un sistema PTS: los codificantes para proteínas HPrK (dos) y para HPr.

El mutante portador de la delección del gen denominado *hprK_relA* (MPO809) no mostró ninguna característica distintiva en comparación con TFA silvestre, lo que parecía descartar que el producto de este gen esté implicado en la base molecular del fenómeno de represión catabólica. A pesar de eso, podría ocurrir que esta proteína fuera redundante debido a la existencia del gen *hprK* (locus 3852). No obstante, el fenotipo del doble mutante *hprK_relA* y *hprK* (estirpe MPO824) tampoco mostró una clara implicación de estas proteínas en la expresión de los genes *thn* en ninguna condición. Esta falta de participación en el proceso de represión catabólica contrasta con lo observado para *S. meliloti*, donde la delección del componente HPrK produce un incremento de los niveles de represión asociados al incremento de los niveles de HPr fosforilada en el residuo de histidina.

Por último, el mutante de delección en *hpr* (MPO815) tampoco presentó defectos en la represión rápida de los genes *thn* en presencia de β -HB, confirmando que esta estirpe sigue identificando la señal que promueve la represión inmediata de los genes *thn* en presencia de fuentes de carbono preferenciales. Sin embargo, mostró un mayor tiempo de generación en β -HB y una fase de latencia más prolongada al transferir las células de un medio con β -HB 40 mM a otro con tetralina como única fuente de carbono. Además, indujo los genes *thn* de manera muy limitada durante el crecimiento en esta última condición y no fue capaz de inducir los genes *thn* en presencia de β -HB y tetralina simultáneamente en el tiempo y al nivel que ocurre en TFA.

Estos resultados muestran un fenotipo opuesto a aquel descrito de “relajación” de la represión catabólica para el mutante Δhpr de *S. meliloti*, siendo, por el contrario, muy

parecido al obtenido con la delección de *hprK* o con la mutación de la serina de HPr en la misma bacteria, que provoca un aumento del nivel de represión catabólica, una inducción de los genes *lac* muy por debajo de lo normal incluso en presencia de lactosa y un crecimiento deficiente en varias fuentes de carbono distintas, pero no en medio rico. El fenotipo de super-represión de MPO815 es también común con el obtenido para los mutantes de *ptsO* (NPr) en *P. putida* en relación a la degradación de tolueno (Cases *et al.*, 2001).

Del mutante MPO815 resultó llamativa la dificultad de crecimiento en tetralina (reflejado en el aumento de la fase de latencia) sólo cuando los cultivos provenían del crecimiento en β -HB, denotando que el estado fisiológico previo de las células estaba relacionado con la capacidad de adaptación al nuevo medio en el que la bacteria debía crecer sólo a expensas del compuesto aromático. Esa observación, sumada al conocimiento de que existen numerosos casos descritos (en *P. putida*, *R. eutropha* y *A. eutrophus*) en los que la alteración del sistema PTS^{Ntr} conlleva una alteración de la capacidad de producción de polímeros de hidroxialcanoatos o hidroxibutirato (Velazquez *et al.*, 2007, Kaddor *et al.*, 2011, Pries *et al.*, 1991), llevó a plantear la posibilidad de que el mutante de delección en *hpr* estuviera afectado en la producción de gránulos de PHB. El análisis de los niveles de acumulación de gránulo mediante tinción con Rojo Nilo confirmó que esa hipótesis era cierta, acumulando el mutante más gránulos de reserva que la estirpe silvestre.

Con los resultados obtenidos y a falta de otras pruebas que pudieran reforzar una interpretación, nuestra propuesta es que la delección de *hpr* en TFA genera un desbalance en la relación carbono/nitrógeno, bien como consecuencia de la alteración en la acumulación de gránulo o como causa de esta (Fig. 63A). El sistema PTS de TFA podría estar relacionado con la regulación del metabolismo del nitrógeno y/o del carbono, como ocurre en muchas otras bacterias. Sería plausible pensar, por tanto, que la alteración de este balance afecta a la acumulación de gránulo, ya que la relación C/N es una de las principales señales que controlan la síntesis de PHB. Alternativamente, la proteína *hpr* podría estar directa o indirectamente controlando la generación del polímero de reserva, de tal manera que su delección genera un incremento en la acumulación de aquel y un desbalance de la relación C/N. En *A. vinelandii*, por ejemplo, se sabe que el componente EIIA^{Ntr} reprime la transcripción del gen *phbR*, que codifica para un activador transcripcional necesario para la expresión del operón de síntesis de PHB (Noguez *et al.*, 2008). Ante

cualquiera de las dos opciones, el aumento de PHB en el mutante debe conllevar que los sistemas de detección interpreten que existe una situación irreal de exceso de carbono, impidiendo la inducción de la ruta de degradación de tetralina.

Dado que los mutantes en los genes codificantes para las proteínas tipo HPrK no han generado ningún fenotipo evidente en represión catabólica, es improbable que estén participando en la base molecular de este proceso. En consecuencia, la proteína HPr debe estar siendo fosforilada sólo por una proteína tipo EI, como ocurre en *E. coli*. Además, y a diferencia de *S. meliloti*, quizás no es la proteína HPr en última instancia la que dirige los procesos de represión en TFA, sino alguna otra (previsiblemente una de las proteínas EIIA) cuyo estado de fosforilación es modificado por HPr. No obstante, los resultados obtenidos hasta la fecha no permiten confirmar que en TFA exista realmente todo un sistema PTS^{Ntr} parecido al de otras bacterias e implicado en represión catabólica. De igual forma, se desconoce a través de qué mecanismos concretos este sistema podría estar alterando la acumulación de gránulos de PHB o la expresión de los genes de degradación de tetralina.

Para llegar a determinar si los componentes del sistema PTS de TFA están realmente sustentando la base molecular del fenómeno de represión catabólica, habría que analizar el fenotipo de mutantes en el único componente EI y en el EII que forma operón con HPr. No obstante, sería prioritario llegar a confirmar los resultados obtenidos con la delección de *hpr* mediante la complementación de los fenotipos de la estirpe mutante con la versión silvestre del gen.

Para el sistema PTS de TFA podrían especularse también otras funciones. Algunos estudios sugieren que la presencia de unos u otros componentes del sistema PTS^{Ntr} y su organización génica pueden ayudar a la interpretación de su función (Pfluger-Grau *et al.*, 2010). Así, la presencia de un componente HPrK (ausente en muchas bacterias, como por ejemplo en las γ -proteobacterias) formando operón con los otros elementos PTS, puede estar indicando la implicación del sistema en represión catabólica, aunque no parezca ser el caso de TFA. Por otro lado, la presencia de los genes *pts* en operón con el gen *rpoN* (codificante del sigma alternativo δ^{54}), indicaría una función relacionada con el metabolismo del nitrógeno. Por último, es común también encontrar, como es el caso de TFA, al gen *yhbJ* (que controla los niveles de la enzima glucosamina-6-fosfato sintasa o GlmS) adyacente a los demás genes *pts*. En este caso, se postula una función relacionada con procesos que atañen a la integridad de la envoltura celular.

Merece la pena recalcar, por último, que TFA posee 3 componentes EIIA codificados por genes distintos. En muchos de los casos descritos en los distintos grupos bacterianos en los que el sistema PTS está relacionado con algún proceso de regulación, se desconoce cuál es el agente específico del sistema que promueve la regulación. Sin embargo, en la gran mayoría de los que se conoce, es el componente EIIA el principal efector (Pfluger-Grau *et al.*, 2010). Los genes para EIIA del cromosoma de TFA codifican para uno de tipo EIIA^{Fru} y dos EIIA^{Ntr}. El gen para EIIA^{Fru} está en la misma región que *hprK*, *yhbJ* y *hpr*, por lo que se le supondría un papel en la regulación del carbono. Otro de los EIIA^{Ntr} (gen 286), sin embargo, colocaliza con una proteína moduladora de σ^{54} , resultando tentador asignarle, en consecuencia, un papel en regulación del nitrógeno. Finalmente, el tercer gen (173) para EIIA^{Ntr} se expresa adyacente y en la misma dirección a 5 genes implicados en el transporte de potasio (genes *kdp*). Este último tipo de organización, común entre muchas proteobacterias, puede estar poniendo de manifiesto una implicación del sistema PTS^{Ntr} en el control de la homeostasis del potasio a través del control de los genes *kdp*, como ocurre en *E. coli* (Luttmann *et al.*, 2009). En consecuencia, el sistema PTS^{Ntr} de TFA se muestra como un candidato de gran interés para el estudio de la base molecular de la represión catabólica y, posiblemente, de otros procesos celulares.

Finalmente, aunque sigue desconociéndose la base molecular de la represión de los genes de degradación de tetralina en presencia de fuentes de carbono preferenciales, el fenotipo de los mutantes MPO815 y MPO209 parece evidenciar que los mecanismos que afectan a la represión o a la inducción de estos genes son independientes. Si bien la deficiencia en la síntesis de PHB afecta positivamente a la inducción de los genes *thn*, no tiene efecto en el apagado inmediato que los mismos genes sufren tras la adición de β -HB a los cultivos creciendo en tetralina. La represión de los operones *thn* en ese caso ocurre de manera muy rápida, resultando improbable que la señal principal sea la síntesis de PHB.

Una posibilidad que no ha sido explorada en cuanto al fenómeno de represión catabólica en TFA es que la información sobre la disponibilidad de las fuentes de carbono en la célula pueda estar siendo integrada en la regulación de los genes de degradación de tetralina a través del coactivador ThnY (Fig. 63B). Como se ha descrito en la Introducción de esta Tesis, la proteína ThnY puede ser reducida por el componente ThnA3 del complejo dioxigenasa inicial implicado en el metabolismo de la tetralina y existen evidencias de que, en dicho estado de reducción, ThnY no permitiría la inducción de la ruta de degradación de tetralina. Es posible que otras proteínas ejerzan un control parecido sobre el coactivador

A

Diagram A illustrates a regulatory network involving the Ntr system, C/N balance, and PHB granules. The components are arranged in a cycle: **Sistema PTS^{Ntr}** (top), **Balance C/N** (left), and **Gránulos PHB** (right). Blue arrows indicate regulatory interactions: from **Balance C/N** to **Sistema PTS^{Ntr}**, from **Sistema PTS^{Ntr}** to **Gránulos PHB**, and from **Gránulos PHB** back to **Balance C/N**.

B

Diagram B provides a detailed view of the signaling pathway. On the left, a red oval labeled **HPrK** has a red 'X' over an arrow pointing to **HPr**, indicating inhibition. The central part shows a cycle of phosphorylation and dephosphorylation: **EIIA^{Fru}-P** (green circle) is converted to **EIIA^{Fru}** (grey oval), which then converts **HPr** to **HPr-P** (green circle). **HPr-P** is converted back to **HPr** by **EINtr-P** (green circle), which is then converted to **EINtr** (grey oval). **EINtr** converts **Piruvato** to **Enolpiruvato-P** (green circle), which is then converted back to **Piruvato**. Red question marks with arrows indicate unknown or hypothesized steps in the phosphorylation/dephosphorylation cycle. On the right, two dashed blue arrows with question marks point from the **HPr** and **HPr-P** states towards a regulatory network. This network includes a blue circle labeled **ThnY ?**, a blue DNA double helix labeled **Regulación transcripcional**, and a micrograph of a bacterial cell labeled **Acumulación gránulo PHB**. A dashed blue arrow with a question mark points from the **Regulación transcripcional** to the **Acumulación gránulo PHB** micrograph.

214

CONCLUSIONES

1. En presencia de dos fuentes de carbono y energía, una preferencial (como el β -hidroxibutirato o el ácido sebácico) y otra no (como la tetralina), los cultivos de *S. macroglutabida* TFA no muestran un crecimiento de tipo diáuxico.
2. En cultivos de TFA crecidos en presencia de tetralina y β -hidroxibutirato, la inducción de los genes *thn* se produce antes de que se agote la fuente de carbono y energía preferencial, siendo el nivel máximo de inducción alcanzado inversamente proporcional a la concentración de β -hidroxibutirato en el medio.
3. En condiciones de represión catabólica se produce en TFA una mayor abundancia de enzimas implicadas en rutas anabólicas y de obtención de energía y una disminución de las implicadas en degradación de tetralina, rutas catabólicas y respuesta a estrés.
4. La proteína CdnL de TFA se encuentra más abundantemente en células con mayor tasa de división y, al ser esencial para la supervivencia de la bacteria, como ocurre en otras, su función no ha podido ser caracterizada.
5. La proteína transductora de señales con dominios CBS de TFA, muestra un patrón de expresión diferencial en células crecidas en tetralina o en tetralina más β -hidroxibutirato, pero no está implicada en la expresión de los genes *thn*. Además, su función es prescindible en las condiciones estudiadas.
6. Los sistemas de dos componentes FixL-FixJ estudiados en esta Tesis no están implicados en la represión catabólica de los genes *thn*. Además, su función es prescindible en las condiciones estudiadas.
7. La proteína HPr del sistema PTS es necesaria para la correcta inducción de los genes de degradación de tetralina. El mecanismo implicado podría estar conectado con la cantidad de gránulos de PHB acumulados en la célula.
8. En TFA existen otras quinasas responsables de la fosforilación de la proteína Hpr, ya que los mutantes en las proteínas anotadas como HPrK y HPrK_reIA no están afectados en la inducción de los genes *thn*.
9. La rápida represión de los genes *thn* en respuesta a la presencia de una fuente de carbono preferencial en el mutante de delección de *hpr* (MPO815) o en el de inserción de *phaC* (MPO209), indica la existencia de un mecanismo de control independiente del metabolismo del gránulo de PHB.

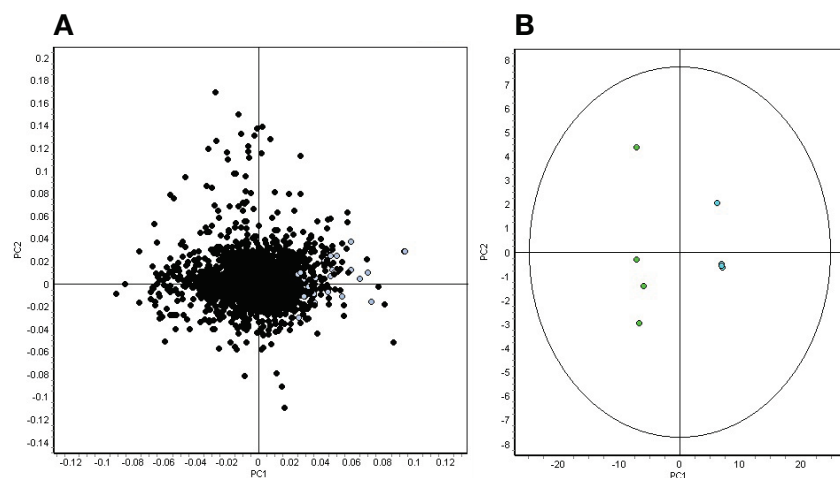


FIG. 1. Análisis de componentes realizado con DeCyder sobre el experimento 2D-DIGE en que se aplicó un rango de pI de 3 a 11. A. Nube de puntos representando cada una de las proteínas detectadas en el total de los geles. Los puntos de color gris son los identificados en este ensayo. B. Representación de las 4 réplicas biológicas del crecimiento en tetracina (puntos verdes) o del crecimiento en condiciones de represión catabólica (puntos azules). El componente 1 acumuló el 76,3% de la varianza total.

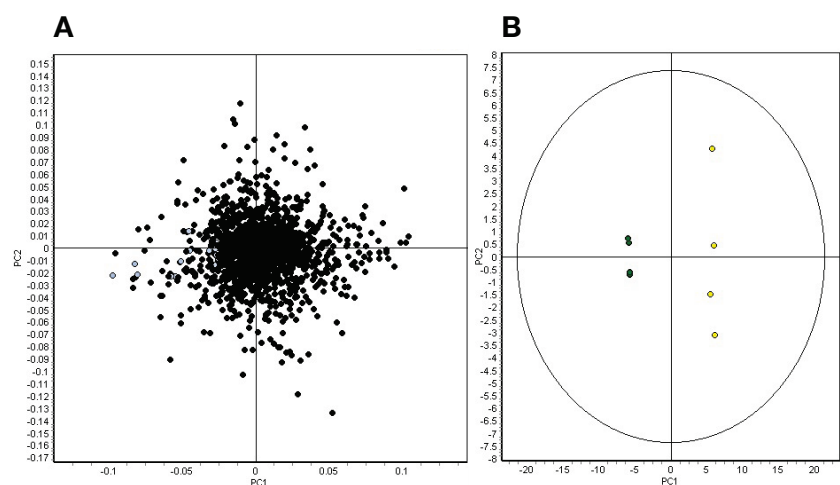


FIG 2. Análisis de componentes realizado con DeCyder sobre el experimentos 2D-DIGE en que se aplicó un rango de pI de 3 a 7. A. Nube de puntos representando cada una de las proteínas detectadas en el total de los geles. Los puntos de color gris son los identificados en este ensayo. B. Representación de las 4 réplicas biológicas del crecimiento en tetracina (puntos amarillos) o del crecimiento en condiciones de represión catabólica (puntos verdes). El componente 1 acumuló el 71,5% de la varianza total.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, *et al.* (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25(17):3389-3402.
- Andujar E, Hernaez MJ, Kaschabek SR, *et al.* (2000) Identification of an extradiol dioxygenase involved in tetralin biodegradation: gene sequence analysis and purification and characterization of the gene product. *Journal of bacteriology* 182(3):789-795.
- Andujar E & Santero E (2003) Site-directed mutagenesis of an extradiol dioxygenase involved in tetralin biodegradation identifies residues important for activity or substrate specificity. *Microbiology* 149(Pt 6):1559-1567.
- Basu A, Apte SK, & Phale PS (2006) Preferential utilization of aromatic compounds over glucose by *Pseudomonas putida* CSV86. *Applied and environmental microbiology* 72(3):2226-2230.
- Basu D, Khare G, Singh S, *et al.* (2009) A novel nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis* is a sequence homolog of GroEL. *Nucleic acids research* 37(15):4944-4954.
- Bateman A (1997) The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends in biochemical sciences* 22(1):12-13.
- Batut J, Daveran-Mingot ML, David M, *et al.* (1989) fixK, a gene homologous with fnr and crp from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *The EMBO journal* 8(4):1279-1286.
- Baughn AD, Garforth SJ, Vilcheze C, *et al.* (2009) An anaerobic-type alpha-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase completes the oxidative tricarboxylic acid cycle of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens* 5(11):e1000662.
- Beisel CL & Storz G (2011) The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*. *Molecular cell* 41(3):286-297.
- Bell SG, Yang W, Yorke JA, *et al.* (2012) Structure and function of CYP108D1 from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444: an aromatic hydrocarbon-binding P450 enzyme. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 68(Pt 3):277-291.
- Bernhardt J, Volker U, Volker A, *et al.* (1997) Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis*--a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology* 143(Pt 3):999-1017.
- Bernhardt J, Weibezahn J, Scharf C, *et al.* (2003) *Bacillus subtilis* during feast and famine: visualization of the overall regulation of protein synthesis during glucose starvation by proteome analysis. *Genome research* 13(2):224-237.
- Bibikov SI, Barnes LA, Gitin Y, *et al.* (2000) Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding determinants in the aerotaxis signal transducer Aer of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11):5830-5835.

- Biemans-Oldehinkel E, Mahmood NA, & Poolman B (2006) A sensor for intracellular ionic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(28):10624-10629.
- Blair DF, Kim DY, & Berg HC (1991) Mutant MotB proteins in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 173(13):4049-4055.
- Blanvillain S, Meyer D, Boulanger A, et al. (2007) Plant carbohydrate scavenging through tonB-dependent receptors: a feature shared by phytopathogenic and aquatic bacteria. *PloS one* 2(2):e224.
- Blencke HM, Homuth G, Ludwig H, et al. (2003) Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metabolic engineering* 5(2):133-149.
- Borg S, Hofmann J, Pollithy A, et al. (2014) New Vectors for Chromosomal Integration Enable High-Level Constitutive or Inducible Magnetosome Expression of Fusion Proteins in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Applied and environmental microbiology* 80(8):2609-2616.
- Brandt U, Raberg M, Voigt B, et al. (2012) Elevated poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in mutants of *Ralstonia eutropha* H16 defective in lipopolysaccharide biosynthesis. *Applied microbiology and biotechnology* 95(2):471-483.
- Bringhurst RM & Gage DJ (2002) Control of inducer accumulation plays a key role in succinate-mediated catabolite repression in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 184(19):5385-5392.
- Brioukhanov AL, Netrusov AI, & Eggen RI (2006) The catalase and superoxide dismutase genes are transcriptionally up-regulated upon oxidative stress in the strictly anaerobic archaeon *Methanosarcina barkeri*. *Microbiology* 152(Pt 6):1671-1677.
- Budde CF, Mahan AE, Lu J, et al. (2010) Roles of multiple acetoacetyl coenzyme A reductases in polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of bacteriology* 192(20):5319-5328.
- Cases I, Perez-Martin J, & de Lorenzo V (1999) The IIA^{Ntr} (PtsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the sigma⁵⁴-dependent Pu promoter of the TOL plasmid. *The Journal of biological chemistry* 274(22):15562-15568.
- Cases I, Velazquez F, & de Lorenzo V (2001) Role of ptsO in carbon-mediated inhibition of the Pu promoter belonging to the pWW0 *Pseudomonas putida* plasmid. *Journal of bacteriology* 183(17):5128-5133.
- Cases I, Velazquez F, & de Lorenzo V (2007) The ancestral role of the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system (PTS) as exposed by comparative genomics. *Research in microbiology* 158(8-9):666-670.
- Cayuela ML, Elias-Arnanz M, Penalver-Mellado M, et al. (2003) The *Stigmatella aurantiaca* homolog of *Myxococcus xanthus* high-mobility-group A-type transcription factor CarD: insights into the functional modules of CarD and their distribution in bacteria. *Journal of bacteriology* 185(12):3527-3537.

- Cebolla A, Royo JL, De Lorenzo V, *et al.* (2002) Improvement of recombinant protein yield by a combination of transcriptional amplification and stabilization of gene expression. *Applied and environmental microbiology* 68(10):5034-5041.
- Cebolla A, Sousa C, & de Lorenzo V (2001) Rational design of a bacterial transcriptional cascade for amplifying gene expression capacity. *Nucleic acids research* 29(3):759-766.
- Chai W & Stewart V (1999) RNA sequence requirements for NasR-mediated, nitrate-responsive transcription antitermination of the *Klebsiella oxytoca* M5al nasF operon leader. *Journal of molecular biology* 292(2):203-216.
- Chen C & Beattie GA (2007) Characterization of the osmoprotectant transporter OpuC from *Pseudomonas syringae* and demonstration that cystathionine-beta-synthase domains are required for its osmoregulatory function. *Journal of bacteriology* 189(19):6901-6912.
- Chen J & Xie J (2011) Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *Journal of cellular biochemistry* 112(10):2694-2702.
- Choi SK & Saier MH, Jr. (2005) Regulation of sigL expression by the catabolite control protein CcpA involves a roadblock mechanism in *Bacillus subtilis*: potential connection between carbon and nitrogen metabolism. *Journal of bacteriology* 187(19):6856-6861.
- Daniels C, Godoy P, Duque E, *et al.* (2010) Global regulation of food supply by *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Journal of bacteriology* 192(8):2169-2181.
- Darbon E, Servant P, Poncet S, *et al.* (2002) Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P-GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis* glpFK expression. *Molecular microbiology* 43(4):1039-1052.
- De Lay N & Gottesman S (2009) The Crp-activated small noncoding regulatory RNA CyaR (RyeE) links nutritional status to group behavior. *Journal of bacteriology* 191(2):461-476.
- De Mot R & Vanderleyden J (1994) The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Molecular microbiology* 12(2):333-334.
- Degelau A, Scheper, T., Bailey, J.E., Guske, C. (1995) Fluorometric measurement of poly-b-hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry. *Applied microbiology and biotechnology* 42(5):653-657.
- del Castillo T & Ramos JL (2007) Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways. *Journal of bacteriology* 189(18):6602-6610.
- Deutscher J, Francke C, & Postma PW (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 70(4):939-1031.
- Dinamarca MA, Ruiz-Manzano A, & Rojo F (2002) Inactivation of cytochrome o ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *Journal of bacteriology* 184(14):3785-3793.

- Dorn E, Hellwig M, Reineke W, *et al.* (1974) Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. *Archives of microbiology* 99(1):61-70.
- Elias-Arnanz M, Padmanabhan S, & Murillo FJ (2010) The regulatory action of the myxobacterial CarD/CarG complex: a bacterial enhanceosome? *FEMS microbiology reviews* 34(5):764-778.
- Ferrante AA, Augliera J, Lewis K, *et al.* (1995) Cloning of an organic solvent-resistance gene in *Escherichia coli*: the unexpected role of alkylhydroperoxide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(17):7617-7621.
- Figurski DH & Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(4):1648-1652.
- Filiatrault MJ, Stodghill PV, Wilson J, *et al.* (2013) CrcZ and CrcX regulate carbon source utilization in *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strain DC3000. *RNA biology* 10(2):245-255.
- Fraaije MW, Pikkemaat M, & Van Berkel W (1997) Enigmatic Gratuitous Induction of the Covalent Flavoprotein Vanillyl-Alcohol Oxidase in *Penicillium simplicissimum*. *Applied and environmental microbiology* 63(2):435-439.
- Friedman AM, Long SR, Brown SE, *et al.* (1982) Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18(3):289-296.
- Fuchs G, Boll M, & Heider J (2011) Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nature reviews. Microbiology* 9(11):803-816.
- Galperin MY (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *Journal of bacteriology* 188(12):4169-4182.
- Gao J, Ellis LB, & Wackett LP (2010) The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: improving public access. *Nucleic acids research* 38(Database issue):D488-491.
- Garcia LL, Rivas-Marin E, Floriano B, *et al.* (2011) ThnY is a ferredoxin reductase-like iron-sulfur flavoprotein that has evolved to function as a regulator of tetralin biodegradation gene expression. *The Journal of biological chemistry* 286(3):1709-1718.
- Garcia PP, Brighurst RM, Arango Pinedo C, *et al.* (2010) Characterization of a two-component regulatory system that regulates succinate-mediated catabolite repression in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 192(21):5725-5735.
- Garcia-Gonzalez V, Govantes F, Porrua O, *et al.* (2005) Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *Journal of bacteriology* 187(1):155-167.
- Garcia-Maurino SM, Perez-Martinez I, Amador CI, *et al.* (2013) Transcriptional activation of the CrcZ and CrcY regulatory RNAs by the CbrB response regulator in *Pseudomonas putida*. *Molecular microbiology* 89(1):189-205.
- Garcia-Moreno D, Abellon-Ruiz J, Garcia-Heras F, *et al.* (2010) CdnL, a member of the large CarD-like family of bacterial proteins, is vital for *Myxococcus xanthus* and differs

- functionally from the global transcriptional regulator CarD. *Nucleic acids research* 38(14):4586-4598.
- Gerischer U (2002) Specific and global regulation of genes associated with the degradation of aromatic compounds in bacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 4(2):111-121.
- Gerth U, Kock H, Kusters I, *et al.* (2008) Clp-dependent proteolysis down-regulates central metabolic pathways in glucose-starved *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 190(1):321-331.
- Gibson J & C SH (2002) Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annual review of microbiology* 56:345-369.
- Gilles-Gonzalez MA & Gonzalez G (1993) Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *The Journal of biological chemistry* 268(22):16293-16297.
- Godoy P, Ramos-Gonzalez MI, & Ramos JL (2001) Involvement of the TonB system in tolerance to solvents and drugs in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Journal of bacteriology* 183(18):5285-5292.
- Goodwin RA & Gage DJ (2014) Biochemical characterization of a nitrogen-type phosphotransferase system reveals enzyme EINtr integrates carbon and nitrogen signaling in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*.
- Gorke B & Stulke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature reviews. Microbiology* 6(8):613-624.
- Grundy FJ, Waters DA, Takova TY, *et al.* (1993) Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 10(2):259-271.
- Gulten G & Sacchettini JC (2013) Structure of the Mtb CarD/RNAP beta-lobes complex reveals the molecular basis of interaction and presents a distinct DNA-binding domain for Mtb CarD. *Structure* 21(10):1859-1869.
- Gunnewijk MG & Poolman B (2000) Phosphorylation state of HPr determines the level of expression and the extent of phosphorylation of the lactose transport protein of *Streptococcus thermophilus*. *The Journal of biological chemistry* 275(44):34073-34079.
- Hansen EJ & Juni E (1974) Two routes for synthesis of phosphoenolpyruvate from C4-dicarboxylic acids in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications* 59(4):1204-1210.
- He J, Ochiai A, Fukuda Y, *et al.* (2008) A putative lipoprotein of *Sphingomonas* sp. strain A1 binds alginate rather than a lipid moiety. *FEMS microbiology letters* 288(2):221-226.
- Hernaez MJ, Andujar E, Rios JL, *et al.* (2000) Identification of a serine hydrolase which cleaves the alicyclic ring of tetralin. *Journal of bacteriology* 182(19):5448-5453.
- Hernaez MJ, Floriano B, Rios JJ, *et al.* (2002) Identification of a hydratase and a class II aldolase involved in biodegradation of the organic solvent tetralin. *Applied and environmental microbiology* 68(10):4841-4846.

- Hernaez MJ, Reineke W, & Santero E (1999) Genetic analysis of biodegradation of tetralin by a *Sphingomonas* strain. *Applied and environmental microbiology* 65(4):1806-1810.
- Hernández Silva MJ (2000) Caracterización molecular de la ruta de degradación de tetralina en *Sphingomonas* sp. estirpe TFA. (Universidad de Sevilla).
- Heukeshoven J & Dernick R (1985) Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* 326:91-101.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, *et al.* (1998) A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212(1):77-86.
- Hogema BM, Arents JC, Bader R, *et al.* (1998) Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIAGlc. *Molecular microbiology* 30(3):487-498.
- Hogema BM, Arents JC, Inada T, *et al.* (1997) Catabolite repression by glucose 6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 24(4):857-867.
- Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, *et al.* (1998) Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of bacteriology* 180(2):366-376.
- Ignoul S & Eggermont J (2005) CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *American journal of physiology. Cell physiology* 289(6):C1369-1378.
- Inada T, Kimata K, & Aiba H (1996) Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 1(3):293-301.
- Inoue H, Nojima H, & Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23-28.
- Jamsen J, Tuominen H, Salminen A, *et al.* (2007) A CBS domain-containing pyrophosphatase of *Moorella thermoacetica* is regulated by adenine nucleotides. *The Biochemical journal* 408(3):327-333.
- Jault JM, Fieulaine S, Nessler S, *et al.* (2000) The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *The Journal of biological chemistry* 275(3):1773-1780.
- Jelesko JG & Leigh JA (1994) Genetic characterization of a *Rhizobium meliloti* lactose utilization locus. *Molecular microbiology* 11(1):165-173.
- Jeong KC, Hung KF, Baumler DJ, *et al.* (2008) Acid stress damage of DNA is prevented by Dps binding in *Escherichia coli* O157:H7. *BMC microbiology* 8:181.
- Jiménez-Fernández A, López-Sánchez, A., Calero, P., Govantes, F. (2014) The c-di-GMP phosphodiesterase BifA regulates biofilm development in *Pseudomonas putida*. *Environmental microbiology reports*.

- Jin S, Ishimoto K, & Lory S (1994) Nucleotide sequence of the *rpoN* gene and characterization of two downstream open reading frames in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 176(5):1316-1322.
- Jin S & Sonenshein AL (1994) Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *Journal of bacteriology* 176(15):4680-4690.
- Kaddor C & Steinbuchel A (2011) Effects of homologous phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system proteins on carbohydrate uptake and poly(3-Hydroxybutyrate) accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and environmental microbiology* 77(11):3582-3590.
- Kalamorz F, Reichenbach B, Marz W, et al. (2007) Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 65(6):1518-1533.
- Kimata K, Takahashi H, Inada T, et al. (1997) cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(24):12914-12919.
- Kneuper H, Janausch IG, Vijayan V, et al. (2005) The nature of the stimulus and of the fumarate binding site of the fumarate sensor DcuS of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 280(21):20596-20603.
- Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, et al. (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(8):4678-4683.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-2948.
- Lazar SW & Kolter R (1996) SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *Journal of bacteriology* 178(6):1770-1773.
- Ledesma-Garcia L (2012) Caracterización funcional de ThnY y de la ferredoxina ThnA3 en la regulación de los genes de degradación de tetralina en *Sphingomonas macrogolita* estirpe TFA. (Pablo de Olavide).
- Ledesma-Garcia L, Reyes-Ramirez F, & Santero E (2013) The ferredoxin ThnA3 negatively regulates tetralin biodegradation gene expression via ThnY, a ferredoxin reductase that functions as a regulator of the catabolic pathway. *PloS one* 8(9):e73910.
- Leung KY, Siame BA, Snowball H, et al. (2011) Type VI secretion regulation: crosstalk and intracellular communication. *Current opinion in microbiology* 14(1):9-15.
- Lin JT & Stewart V (1996) Nitrate and nitrite-mediated transcription antitermination control of *nasF* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Journal of molecular biology* 256(3):423-435.

- Liu M, Durfee T, Cabrera JE, *et al.* (2005) Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 280(16):15921-15927.
- Lopez-Sanchez A, Floriano B, Andujar E, *et al.* (2010) Tetralin-induced and ThnR-regulated aldehyde dehydrogenase and beta-oxidation genes in *Sphingomonas macrogolitabida* strain TFA. *Applied and environmental microbiology* 76(1):110-118.
- Lopez-Sanchez A, Rivas-Marin E, Martinez-Perez O, *et al.* (2009) Co-ordinated regulation of two divergent promoters through higher-order complex formation by the LysR-type regulator ThnR. *Molecular microbiology* 73(6):1086-1100.
- Ludwig H, Rebhan N, Blencke HM, *et al.* (2002) Control of the glycolytic gapA operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. *Molecular microbiology* 45(2):543-553.
- Luttmann D, Heermann R, Zimmer B, *et al.* (2009) Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA(Ntr) in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 72(4):978-994.
- Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, *et al.* (2007) The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 6(4):697-707.
- Madison LL & Huisman GW (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 63(1):21-53.
- Mahadevan R, Edwards JS, & Doyle FJ, 3rd (2002) Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. *Biophysical journal* 83(3):1331-1340.
- Mahmood NA, Biemans-Oldehinkel E, & Poolman B (2009) Engineering of ion sensing by the cystathionine beta-synthase module of the ABC transporter OpuA. *The Journal of biological chemistry* 284(21):14368-14376.
- Martin-Cabello G, Moreno-Ruiz E, Morales V, *et al.* (2011) Involvement of poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in catabolite repression of tetralin biodegradation genes in *Sphingomonas macrogolitabida* strain TFA. *Environmental microbiology reports* 3(5):627-631.
- Martinez-Perez MO (2008) Regulación de los genes de degradación de tetralina. (Sevilla).
- Martinez-Perez O, Lopez-Sanchez A, Reyes-Ramirez F, *et al.* (2007) Integrated response to inducers by communication between a catabolic pathway and its regulatory system. *Journal of bacteriology* 189(10):3768-3775.
- Martinez-Perez O, Moreno-Ruiz E, Floriano B, *et al.* (2004) Regulation of tetralin biodegradation and identification of genes essential for expression of thn operons. *Journal of bacteriology* 186(18):6101-6109.
- Merrick MJ & Coppard JR (1989) Mutations in genes downstream of the rpoN gene (encoding sigma 54) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from sigma 54-dependent promoters. *Molecular microbiology* 3(12):1765-1775.
- Mijakovic I, Poncet S, Galinier A, *et al.* (2002) Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life? *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(21):13442-13447.
- Milanesio P, Arce-Rodriguez A, Munoz A, et al. (2011) Regulatory exaptation of the catabolite repression protein (Crp)-cAMP system in *Pseudomonas putida*. *Environmental microbiology* 13(2):324-339.
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*.
- Misko TP, Mitchell WJ, Meadow ND, et al. (1987) Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Reconstitution of inducer exclusion in *Salmonella typhimurium* membrane vesicles. *The Journal of biological chemistry* 262(33):16261-16266.
- Miwa Y, Nakata A, Ogiwara A, et al. (2000) Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (cre) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic acids research* 28(5):1206-1210.
- Moglich A, Ayers RA, & Moffat K (2009) Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* 17(10):1282-1294.
- Morales G, Ugidos A, & Rojo F (2006) Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and cbb3-1 terminal oxidases. *Environmental microbiology* 8(10):1764-1774.
- Moreno R, Fonseca P, & Rojo F (2012) Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Molecular microbiology* 83(1):24-40.
- Moreno R, Hernandez-Arranz S, La Rosa R, et al. (2014) The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* co-operate in catabolite repression and formation of RNA complexes with specific target motifs. *Environmental microbiology*.
- Moreno R, Martinez-Gomariz M, Yuste L, et al. (2009) The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics* 9(11):2910-2928.
- Moreno Ruiz E (2004) Caracterización funcional de los genes thnA1, thnA2, thnA3 y thnA4 y estudio de mutantes afectados en represión catabólica en *Sphingomonas macrogolitabida* estirpe TFA. (Universidad Pablo de Olavide).
- Moreno-Ruiz E, Hernaez MJ, Martinez-Perez O, et al. (2003) Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolitabida* strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. *Journal of bacteriology* 185(6):2026-2030.
- Moses V & Prevost C (1966) Catabolite repression of beta-galactosidase synthesis in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal* 100(2):336-353.
- New AM, Cerulus B, Govers SK, et al. (2014) Different levels of catabolite repression optimize growth in stable and variable environments. *PLoS biology* 12(1):e1001764.
- Nicolas FJ, Ruiz-Vazquez RM, & Murillo FJ (1994) A genetic link between light response and multicellular development in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Genes & development* 8(19):2375-2387.

- Noda Y, Nishikawa S, Shiozuka K, *et al.* (1990) Molecular cloning of the protocatechuate 4,5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. *Journal of bacteriology* 172(5):2704-2709.
- Noguez R, Segura D, Moreno S, *et al.* (2008) Enzyme I NPr, NPr and IIA Ntr are involved in regulation of the poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 15(4):244-254.
- O'Toole GA, Gibbs KA, Hager PW, *et al.* (2000) The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 182(2):425-431.
- Ohtsubo Y, Delawary M, Kimbara K, *et al.* (2001) BphS, a key transcriptional regulator of bph genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102. *The Journal of biological chemistry* 276(39):36146-36154.
- Ohtsubo Y, Goto H, Nagata Y, *et al.* (2006) Identification of a response regulator gene for catabolite control from a PCB-degrading beta-proteobacteria, *Acidovorax* sp. KKS102. *Molecular microbiology* 60(6):1563-1575.
- Ozlu N, Akten B, Timm W, *et al.* (2010) Phosphoproteomics. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 2(3):255-276.
- Park SJ, McCabe J, Turna J, *et al.* (1994) Regulation of the citrate synthase (gltA) gene of *Escherichia coli* in response to anaerobiosis and carbon supply: role of the arcA gene product. *Journal of bacteriology* 176(16):5086-5092.
- Parra-Lopez C, Baer MT, & Groisman EA (1993) Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. *The EMBO journal* 12(11):4053-4062.
- Petersen S, de Graaf AA, Eggeling L, *et al.* (2000) In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *The Journal of biological chemistry* 275(46):35932-35941.
- Petruschka L, Burchhardt G, Muller C, *et al.* (2001) The cyo operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. *Molecular genetics and genomics* : MGG 266(2):199-206.
- Pflugger-Grau K & Gorke B (2010) Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends in microbiology* 18(5):205-214.
- Pinedo CA, Bringhurst RM, & Gage DJ (2008) *Sinorhizobium meliloti* mutants lacking phosphotransferase system enzyme HPr or EIIA are altered in diverse processes, including carbon metabolism, cobalt requirements, and succinoglycan production. *Journal of bacteriology* 190(8):2947-2956.
- Pinedo CA & Gage DJ (2009) HPrK regulates succinate-mediated catabolite repression in the gram-negative symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 191(1):298-309.
- Polayes DA, Rice PW, Garner MM, *et al.* (1988) Cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein as a repressor of transcription of the spf gene of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 170(7):3110-3114.

- Poole LB (2005) Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Archives of biochemistry and biophysics* 433(1):240-254.
- Potter M & Steinbuchel A (2005) Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* 6(2):552-560.
- Powell BS, Court DL, Inada T, *et al.* (1995) Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the rpoN operon of *Escherichia coli*. Enzyme I^{Ntr} affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an *erats* mutant. *The Journal of biological chemistry* 270(9):4822-4839.
- Pries A, Priefert H, Kruger N, *et al.* (1991) Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* gene loci relevant to the poly(beta-hydroxybutyric acid)-leaky phenotype which exhibit homology to ptsH and ptsI of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 173(18):5843-5853.
- Rabus R, Reizer J, Paulsen I, *et al.* (1999) Enzyme I^{Ntr} from *Escherichia coli*. A novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, NPr. *The Journal of biological chemistry* 274(37):26185-26191.
- Reizer J, Hoischen C, Titgemeyer F, *et al.* (1998) A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Molecular microbiology* 27(6):1157-1169.
- Reizer J, Reizer A, Saier MH, Jr., *et al.* (1992) A proposed link between nitrogen and carbon metabolism involving protein phosphorylation in bacteria. *Protein science : a publication of the Protein Society* 1(6):722-726.
- Rinker SD, Gu X, Fortney KR, *et al.* (2012) Permeases of the sap transporter are required for cathelicidin resistance and virulence of *Haemophilus ducreyi* in humans. *The Journal of infectious diseases* 206(9):1407-1414.
- Rojó F (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS microbiology reviews* 34(5):658-684.
- Sambrook J, Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.
- Sarand I, Osterberg S, Holmqvist S, *et al.* (2008) Metabolism-dependent taxis towards (methyl)phenols is coupled through the most abundant of three polar localized Aer-like proteins of *Pseudomonas putida*. *Environmental microbiology* 10(5):1320-1334.
- Sauer U & Eikmanns BJ (2005) The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS microbiology reviews* 29(4):765-794.
- Schreiber AF & Winkler UK (1983) Transformation of tetralin by whole cells of *Pseudomonas stutzeri* AS39. *European journal of applied microbiology and biotechnology* 18(1):4.
- Schroeter R, Voigt B, Jurgen B, *et al.* (2011) The peroxide stress response of *Bacillus licheniformis*. *Proteomics* 11(14):2851-2866.
- Schuetz R, Zamboni N, Zampieri M, *et al.* (2012) Multidimensional optimality of microbial metabolism. *Science* 336(6081):601-604.

- Schumacher MA, Seidel G, Hillen W, *et al.* (2007) Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate. *Journal of molecular biology* 368(4):1042-1050.
- Scott JW, Hawley SA, Green KA, *et al.* (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *The Journal of clinical investigation* 113(2):274-284.
- Selby CP & Sancar A (1995) Structure and function of transcription-repair coupling factor. I. Structural domains and binding properties. *The Journal of biological chemistry* 270(9):4882-4889.
- Senior PJ & Dawes EA (1971) Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *The Biochemical journal* 125(1):55-66.
- Senior PJ & Dawes EA (1973) The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *The Biochemical journal* 134(1):225-238.
- Seo JS, Keum YS, & Li QX (2009) Bacterial degradation of aromatic compounds. *International journal of environmental research and public health* 6(1):278-309.
- Servant P, Le Coq D, & Aymerich S (2005) CcpN (YqzB), a novel regulator for CcpA-independent catabolite repression of *Bacillus subtilis* gluconeogenic genes. *Molecular microbiology* 55(5):1435-1451.
- Sikkema J & de Bont JA (1991) Isolation and initial characterization of bacteria growing on tetralin. *Biodegradation* 2(1):15-23.
- Sikkema J & de Bont JA (1993) Metabolism of tetralin (1,2,3,4-tetrahydronaphthalene) in *Corynebacterium* sp. strain C125. *Applied and environmental microbiology* 59(2):567-572.
- Sikkema J, Poolman B, Konings WN, *et al.* (1992) Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *Journal of bacteriology* 174(9):2986-2992.
- Smith SG, Mahon V, Lambert MA, *et al.* (2007) A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS microbiology letters* 273(1):1-11.
- Spiekermann P, Rehm BH, Kalscheuer R, *et al.* (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of microbiology* 171(2):73-80.
- Srivastava DB, Leon K, Osmundson J, *et al.* (2013) Structure and function of CarD, an essential mycobacterial transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(31):12619-12624.
- Stallings CL & Glickman MS (2011) CarD: a new RNA polymerase modulator in mycobacteria. *Transcription* 2(1):15-18.
- Stallings CL, Stephanou NC, Chu L, *et al.* (2009) CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *Cell* 138(1):146-159.

- Staskawicz B, Dahlbeck D, Keen N, *et al.* (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Journal of bacteriology* 169(12):5789-5794.
- Stasyk T & Huber LA (2004) Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* 4(12):3704-3716.
- Stephen D, Jones C, & Schofield JP (1990) A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic acids research* 18(24):7463-7464.
- Stolz A (2009) Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Applied microbiology and biotechnology* 81(5):793-811.
- Tagami H & Aiba H (1998) A common role of CRP in transcription activation: CRP acts transiently to stimulate events leading to open complex formation at a diverse set of promoters. *The EMBO journal* 17(6):1759-1767.
- Tal S, Smirnoff P, & Okon Y (1990) The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation *Journal of general microbiology* 136:1191-1196.
- Tang K, Jiao N, Liu K, *et al.* (2012) Distribution and functions of TonB-dependent transporters in marine bacteria and environments: implications for dissolved organic matter utilization. *PloS one* 7(7):e41204.
- Taylor BL & Zhulin IB (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 63(2):479-506.
- Taylor BL, Zhulin IB, & Johnson MS (1999) Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria. *Annual review of microbiology* 53:103-128.
- Thompson JD, Higgins DG, & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 22(22):4673-4680.
- Titgemeyer F, Mason RE, & Saier MH, Jr. (1994) Regulation of the raffinose permease of *Escherichia coli* by the glucose-specific enzyme IIA of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Journal of bacteriology* 176(2):543-546.
- Tomas-Gallardo L, Canosa I, Santero E, *et al.* (2006) Proteomic and transcriptional characterization of aromatic degradation pathways in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Proteomics* 6 Suppl 1:S119-132.
- Tomas-Gallardo L, Santero E, Camafeita E, *et al.* (2009) Molecular and biochemical characterization of the tetralin degradation pathway in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Microbial biotechnology* 2(2):262-273.
- Tomas-Gallardo L, Santero E, & Floriano B (2012) Involvement of a putative cyclic amp receptor protein (CRP)-like binding sequence and a CRP-like protein in glucose-mediated catabolite repression of *thn* genes in *Rhodococcus* sp. strain TFB. *Applied and environmental microbiology* 78(15):5460-5462.

- Tuckerman JR, Gonzalez G, & Gilles-Gonzalez MA (2001) Complexation precedes phosphorylation for two-component regulatory system FixL/FixJ of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of molecular biology* 308(3):449-455.
- Valderrama JA, Shingler V, Carmona M, *et al.* (2013) AccR is a master regulator involved in carbon catabolite repression of the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp. CIB. *The Journal of biological chemistry*.
- Velazquez F, di Bartolo I, & de Lorenzo V (2004) Genetic evidence that catabolites of the Entner-Doudoroff pathway signal C source repression of the sigma54 Pu promoter of *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* 186(24):8267-8275.
- Velazquez F, Pfluger K, Cases I, *et al.* (2007) The phosphotransferase system formed by PtsP, PtsO, and PtsN proteins controls production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* 189(12):4529-4533.
- Viana R, Monedero V, Dossonnet V, *et al.* (2000) Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Molecular microbiology* 36(3):570-584.
- Vinuselvi P, Kim MK, Lee SK, *et al.* (2012) Rewiring carbon catabolite repression for microbial cell factory. *BMB reports* 45(2):59-70.
- Voigt B, Hoi le T, Jurgen B, *et al.* (2007) The glucose and nitrogen starvation response of *Bacillus licheniformis*. *Proteomics* 7(3):413-423.
- Warner JB & Lolkema JS (2003) CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 67(4):475-490.
- Weiss LA, Harrison PG, Nickels BE, *et al.* (2012) Interaction of CarD with RNA polymerase mediates *Mycobacterium tuberculosis* viability, rifampin resistance, and pathogenesis. *Journal of bacteriology* 194(20):5621-5631.
- Wieczorek R, Pries A, Steinbuchel A, *et al.* (1995) Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of bacteriology* 177(9):2425-2435.
- Williams TJ, Ertan H, Ting L, *et al.* (2009) Carbon and nitrogen substrate utilization in the marine bacterium *Sphingopyxis alaskensis* strain RB2256. *The ISME journal* 3(9):1036-1052.
- Wood HG & Utter MF (1965) The role of CO₂ fixation in metabolism. *Essays in biochemistry* 1:1-27.
- Wu SQ, Chai W, Lin JT, *et al.* (1999) General nitrogen regulation of nitrate assimilation regulatory gene nasR expression in *Klebsiella oxytoca* M5a1. *Journal of bacteriology* 181(23):7274-7284.
- Yang XF, Goldberg MS, He M, *et al.* (2008) Differential expression of a putative CarD-like transcriptional regulator, LtpA, in *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity* 76(10):4439-4444.
- Zeilstra-Ryalls JH & Kaplan S (1995) Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the fnrL gene. *Journal of bacteriology* 177(22):6422-6431.

